

**Interaktion verschiedener Fibrate und deren Glycinate  
und Glycinat-Methylester mit dem Cytochrom P450-  
System der Rattenleber**

**Dissertation**  
**zur Erlangung des akademischen Grades**  
**doctor medicinae**  
(Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät**  
**der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Heiner Hopf  
geboren am 26.07.1972 in Halle/Saale

**Wesentliche Teile dieser Arbeit sind Inhalt folgender Veröffentlichung:**

Lupp A, Karge E, Hopf H, Machts H, Oelschläger H, Fleck C. 2003. Fibrates and their newly synthesized glycinate or glycinate-methylester derivatives: comparison of the interactions with liver cytochrome P450 dependent monooxygenase and oxidase functions in vitro. Exp Toxic Pathol 54: 433-440.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>5</b>
<b>2. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>7</b>
<b>3. EINLEITUNG.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1. Die Biotransformation.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2. Das Cytochrom P450.....</b>	<b>10</b>
<b>3.3. Der Fettstoffwechsel.....</b>	<b>13</b>
<b>3.4. Fibrate und ihr Einfluß auf den Fettstoffwechsel.....</b>	<b>19</b>
<b>4. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT.....</b>	<b>23</b>
<b>5. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>25</b>
<b>5.1. Versuchstiere.....</b>	<b>25</b>
<b>5.2. Materialgewinnung.....</b>	<b>25</b>
5.2.1. Herstellung des 9000g-Überstandes.....	25
5.2.2. Herstellung der Mikrosomen.....	25
5.2.3. Bestimmung des Proteingehaltes.....	25
<b>5.3. Spektrales Bindungsverhalten an das Cytochrom P450.....</b>	<b>26</b>
<b>5.4. Monooxygenase-Modellreaktionen.....</b>	<b>27</b>
5.4.1. Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD).....	28
5.4.2. Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD).....	29
5.4.3. Pentoxyresorufin-O-Depentylierung (PROD).....	30
5.4.4. p-Nitrophenol-Hydroxylierung (p-NPH).....	32
5.4.5. Ethylmorphin-N-Demethylierung (ENDM).....	33
5.4.6. ω-Laurinsäure-Hydroxylierung (LAOH).....	35
<b>5.5. Oxidase-Modellreaktionen.....</b>	<b>37</b>
5.5.1. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung in Lebermikrosomen.....	37
5.5.2. NADPH-/ Fe <sup>2+</sup> -stimulierte Lipidperoxidation (LPO) in Lebermikrosomen.....	38
5.5.3. Luminol- bzw. Lucigenin-verstärkte mikrosomale Chemilumineszenz.....	39
<b>5.6. Luminol-verstärkte Chemilumineszenz im Rattenvollblut.....</b>	<b>41</b>
<b>5.7. Herkunft der verwendeten Substanzen und Lösungen.....</b>	<b>42</b>
<b>5.8. Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
<b>6. VERSUCHSERGEBNISSE.....</b>	<b>44</b>

<b>6.1. Spektrales Bindungsverhalten der untersuchten Substanzen an das Cytochrom P450.....</b>	<b>44</b>
<b>6.2. Einfluß der untersuchten Substanzen auf die Monooxygenasefunktion des Cytochrom P450.....</b>	<b>44</b>
6.2.1. Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD).....	44
6.2.2. Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD).....	46
6.2.3. Pentoxyresorufin-O-Depentylierung (PROD).....	48
6.2.4. p-Nitrophenol-Hydroxylierung (p-NPH).....	50
6.2.5. Ethylmorphin-N-Demethylierung (ENDM).....	51
6.2.6. $\omega$ -Laurinsäure-Hydroxylierung (LAOH).....	53
<b>6.3. Einfluß der untersuchten Substanzen auf die Oxidasefunktion des Cytochrom P450.....</b>	<b>57</b>
6.3.1. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung in Lebermikrosomen.....	57
6.3.2. NADPH/Fe <sup>2+</sup> -stimulierte Lipidperoxidation (LPO).....	58
6.3.3. Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz in Lebermikrosomen (LCCL).....	60
6.3.4. Luminol-verstärkte Chemilumineszenz in Lebermikrosomen (LMCL).....	61
<b>6.4. Chemilumineszenz im Rattenvollblut (VBCL).....</b>	<b>63</b>
<b>6.5. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse.....</b>	<b>65</b>
Tabelle 7: Die Wirkung der verschiedenen Fibrat-Derivate auf die Chemilumineszenz im Rattenvollblut. Die Symbole haben folgende Bedeutung:.....	69
<b>7. DISKUSSION.....</b>	<b>70</b>
<b>7.1. Einfluß der untersuchten Substanzen auf die Monooxygenasefunktion des Cytochrom P450.....</b>	<b>73</b>
<b>7.2. Mögliche prooxidative/antioxidative Eigenschaften der untersuchten Substanzen.....</b>	<b>79</b>
<b>8. SCHLUSSFOLGERUNGEN.....</b>	<b>83</b>
<b>9. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>84</b>
<b>10. ANHANG.....</b>	<b>95</b>
<b>11. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>131</b>
<b>12. DANKSAGUNG.....</b>	<b>132</b>
<b>13. LEBENSLAUF.....</b>	<b>133</b>

## 1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7-OH-C	7-Hydroxycoumarin
a.d.	Aqua destillata
AN	Anilin
Bez	Bezafibrat
Cip	Ciprofibrat
CL	Chemilumineszenz
Clo	Clofibrat
CPM	counts per minute
CP90 min	in 90 Minuten gezählte Lichtimpulse (counts per 90 minutes)
CSE-Hemmer	Cholesterin-Synthese-Hemmer
ECOD	Ethoxycoumarin-O-Deethylierung
ENDM	Ethylmorphin-N-Demethylierung
EROD	Ethoxyresorufin-O-Deethylierung
FA	Formaldehyd
Fen	Fenofibrat
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
G	Glycinat
Gem	Gemfibrozil
GM	Glycinat-Methylester
HB	Hexobarbital
HPLC	High performance liquid chromatography
K	Kontrolle
LAOH	$\omega$ -Laurinsäure-Hydroxylierung
LCCL	Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz
LMCL	Luminol-verstärkte Chemilumineszenz
LPO	Lipidperoxidation
MDA	Malondialdehyd
MG	molare Masse
Na-P-Puffer	Natrium-Phosphat-Puffer
P450	Cytochrom P450
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbons
PBSGA	Glukose- und Albumin-enthaltender Phosphatpuffer
p-NPH	p-Nitrophenol-Hydroxylierung

PROD	Pentoxyresorufin-O-Depentylierung
Prot.	Protein
Reso	Resorufin
RLU	relative light units
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TCA	Trichloressigsäure
VBCL	Chemilumineszenz im Rattenvollblut

## 2. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollten zehn neu am Institut für Pharmazie der FSU Jena entwickelte Fibrat-Derivate (Ciprofibrat-Glycinat, Ciprofibrat-Glycinat-Methylester, Clofibrat-Glycinat, Clofibrat-Glycinat-Methylester, Bezafibrat-Glycinat, Bezafibrat-Glycinat-Methylester, Fenofibrat-Glycinat, Fenofibrat-Glycinat-Methylester, Gemfibrozil-Glycinat, Gemfibrozil-Glycinat-Methylester) mit den bereits bekannten Substanzen Ciprofibrat, Clofibrat, Bezafibrat, Fenofibrat und Gemfibrozil in ihrer Wirkung auf die Monooxygenase-Funktion des Cytochrom P450 (P450) und hinsichtlich möglicher pro- oder antioxidativer Eigenschaften untersucht werden. Als erstes wurde das spektrale Bindungsverhalten an das P450 bestimmt, um herauszufinden, ob die Substanzen eine Bindung mit dem Enzymsystem eingehen. Weiterhin wurden sieben verschiedene Monooxygenase-Modellreaktionen durchgeführt, die einzelne Familien des P450 charakterisieren. Schließlich wurde durch vier weitere Modellreaktionen der Einfluß der untersuchten Substanzen auf die Oxidasefunktion des P450 sowie auf die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz im Rattenvollblut getestet. Es galt Unterschiede der neuen Derivate zu den „Muttersubstanzen“ festzustellen.

Keines der neu synthetisierten Fibrate zeigte therapeutisch relevante Vorteile gegenüber seiner „Muttersubstanz“ hinsichtlich einer Interaktion mit der Monooxygenasefunktion des P450. Die Substanzen Fenofibrat-Glycinat-Methylester und Gemfibrozil-Glycinat-Methylester sind am ungünstigsten zu bewerten. Sie hemmten die meisten Modellreaktionen bereits, wenn sie eine Zehnerpotenz niedriger dosiert wurden als ihre „Muttersubstanzen“.

Bei Ciprofibrat-Glycinat-Methylester, Clofibrat-Glycinat und Fenofibrat-Glycinat-Methylester sind bei therapeutischer Dosierung Interaktionen mit den untersuchten Monooxygenasen des P450 zu erwarten. Die etablierten Substanzen Ciprofibrat und Clofibrat beeinflussten die gemessenen Modellreaktionen am geringsten. In vivo ist nicht mit Wechselwirkungen mit einer der untersuchten Familien des P450 (1A, 2A, 2B, 2C, 2E, 3A, 4A) zu rechnen. Alle anderen Fibrat-Derivate könnten mindestens eins der untersuchten Isoenzyme des P450 beeinflussen, falls sie im Körper kumulieren.

Bei den Substanzen Ciprofibrat, Clofibrat und Clofibrat-Glycinat-Methylester sind, wenn sie z.B. mit einem durch das P450 3A metabolisierten Cholesterin-Synthese-Hemmer (Simvastatin, Lovastatin, Atorvastatin und Cerivastatin) kombiniert verabreicht werden, kaum Interaktionen zu erwarten.

Lediglich Clofibrat-Glycinat und Gemfibrozil könnten in vivo bei therapeutischer Dosierung die Bildung von Radikalen vermindern. Keine der untersuchten Substanzen hatte „echte“

Scavenger-Eigenschaften oder war in der Lage, in in klinisch relevanten Konzentrationen den oxidativen Zyklus des P450 zu entkoppeln.



### **3. EINLEITUNG**

#### **3.1. Die Biotransformation**

Während hydrophile Pharmaka im allgemeinen durch die Niere eliminiert werden, können lipophile Stoffe auf diesem Weg nur sehr langsam ausgeschieden werden. Solche Substanzen werden deshalb im Körper in hydrophilere, leichter ausscheidbare Metabolite umgewandelt. Man bezeichnet diese Umwandlung als Biotransformation, welche in der Regel in 2 Phasen abläuft (Oesch 1997; Mutschler et al. 2001):

In der ersten Phase wird das Pharmakon oxidativ, reduktiv oder hydrolytisch verändert. Man nennt diese Phase auch Funktionalisierungsreaktion. In der zweiten Phase, der Konjugation, wird das Pharmakon mit einer körpereigenen Substanz gekoppelt, um so seine Hydrophilie zu erhöhen. Konjugationen erfolgen meist an aktivierte Substrate des Intermediärstoffwechsels, z.B. Glukuronsäure, Sulfat, Aminosäuren (v.a. Glycin), Oligopeptide oder Essigsäure. Die Phase 1 ist oft die Voraussetzung für eine Konjugationsreaktion. Die meisten Pharmaka verlieren durch die Metabolisierung an Wirkung. Die Metaboliten können aber auch selber eine pharmakologische Wirksamkeit haben. So entsteht z.B. aus Acetylsalicylsäure durch Esterspaltung Salicylsäure, die ebenfalls pharmakologisch aktiv ist. Manchmal wird dieser Effekt auch in Form von „Prodrugs“ ausgenutzt, wie bei der Enalaprilsäure oder beim Testosterondecanoat, die aufgrund ihrer Lipophilie eine bessere Resorption aufweisen als die aus ihnen entstehenden eigentlich wirksamen Substanzen. Durch die Biotransformation können auch toxische, kanzerogene oder mutagene Substanzen entstehen. Man bezeichnet das als Giftung.

Es werden natürlich nicht nur Pharmaka metabolisiert, sondern auch Xenobiotika (Fremdstoffe) im weitesten Sinne, die z.B. durch die Nahrung aufgenommen werden. Aber auch im Stoffwechsel entstehende körpereigene Substanzen unterliegen der Biotransformation, wie z.B. das Bilirubin, welches an Glukuronsäure gekoppelt wird.

Die Metabolisierung erfolgt vor allem in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums der Hepatozyten (Monooxygenasen, Glukuronosyltransferasen), aber auch in den Mitochondrien, wo z.B. die Aldehyddehydrogenase lokalisiert ist. Die Enzyme des glatten endoplasmatischen Retikulums spielen die größte Rolle für die Metabolisierung von Arzneistoffen. Im glatten endoplasmatischen Retikulum finden sich neben den Oxidasen auch Reduktasen und Glukuronosyltransferasen, welche Glukuronsäure an Hydroxy-, Carboxy-, Amin- und Amidgruppen koppeln. Es enthält also sowohl Enzyme, die die Reaktionen der Phase 1 als auch solche, die die der Phase 2 katalysieren.

Lipophile Arzneistoffe können die Zellmembran der Hepatozyten leicht passieren und erreichen so schnell die Membranen des endoplasmatischen Retikulums. Die Metaboliten gelangen, wahrscheinlich über einen gradientenabhängigen Transportprozeß, wieder in das Blutplasma oder werden in die Galle sezerniert.

Die Metabolisierung sowohl von körpereigenen als auch von Fremdstoffen findet hauptsächlich in der Leber statt. In wesentlich geringerem Maße sind jedoch auch andere Organe, wie Niere, Lunge, Haut und Darm sowie die Darmflora, an der Biotransformation beteiligt.

Werden die Enzyme des endoplasmatischen Retikulums über einige Tage vermehrt beansprucht, kommt es zu einer „Hypertrophie“ des endoplasmatischen Retikulums, die auch morphologisch nachgewiesen werden kann. Es zeigt sich sowohl eine Zunahme der Anzahl der dort lokalisierten Enzyme als auch ein Anstieg deren Aktivität, was zu einer Beschleunigung der Biotransformation führt (= Induktion). Da diese Enzyme in Bezug auf ihre Substrate sehr unspezifisch sind, werden auch andere Substanzen und Pharmaka beschleunigt abgebaut. Diese Interaktion hat große klinische Bedeutung. Die wohl bekannteste und am meisten untersuchte Substanz, die eine Induktion der biotransformierenden Enzyme hervorruft, ist Phenobarbital. Wird die induzierend wirkende Substanz nicht mehr appliziert, normalisieren sich die Enzymkonzentrationen und -aktivitäten wieder.

### **3.2. Das Cytochrom P450**

Werden Leberzellhomogenate fraktioniert zentrifugiert, entstehen Fragmente des endoplasmatischen Retikulums, die als Mikrosomen bezeichnet werden. Die daran gebundenen Enzyme nennt man dementsprechend mikrosomale Enzyme. Zu ihnen gehört auch die Gruppe der Monooxygenasen. Diese Enzyme, die neben Oxygenasen und Dioxygenasen die Oxidationsreaktionen katalysieren, sind Bestandteil des P450-Systems. Das P450 spielt eine wesentliche Rolle bei den Biotransformations-Reaktionen der Phase 1. Es erhielt seinen Namen aufgrund der Lichtabsorption bei 450 nm Wellenlänge nach Reduktion und Komplexbildung mit CO. Bereits 1955 beschrieben Brodie et al. ein Enzymsystem im endoplasmatischen Retikulum der Leber, das in der Lage ist, Xenobiotika oxidativ zu verändern. Als Nelson et al. 1993 die noch heute übliche Klassifikation der P450-Enzyme veröffentlichten, waren bereits 221 verschiedene Formen bekannt. Eine Vielzahl verschiedener P450-Enzyme wurden in den letzten Jahren neu entdeckt. Sie unterscheiden sich durch ihre Molekulargewichte, Aminosäuresequenzen, ihre Substratspezifität und ihre

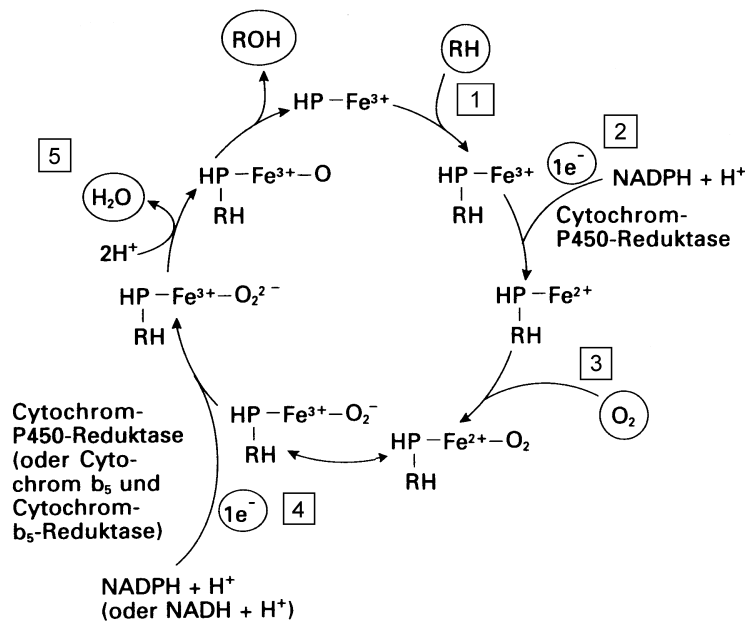
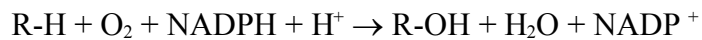
Induzierbarkeit. Nach Nelson et al. (1993) unterteilt man die einzelnen Isoenzyme anhand der Homologie ihrer Aminosäuresequenzen in verschiedene Familien. Diese Enzymfamilien gliedern sich wieder in individuelle Unterfamilien. In die Unterfamilien werden die einzelnen Enzyme eingeordnet. Die Familie wird durch eine Zahl bezeichnet, die Subfamilie durch einen Buchstaben. Eine darauf folgende Zahl bezeichnet das individuelle Enzym (z.B. Cytochrom P450 1A2).

Die Familie 1 scheint eine Rolle bei der Reproduktion der DNA zu spielen und somit an der Regulation von Wachstum und Mitose beteiligt zu sein. Ihre bevorzugten Substrate, PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons), haben strukturelle Ähnlichkeit mit der DNA. Die Familien 2 und 3 sind an der oxidativen Entgiftung von Xenobiotika und Umweltgiften bei Tieren und Menschen beteiligt. Familie 4 oxidiert Fettsäuren und Ester, die durch  $\beta$ -Oxidation nicht metabolisiert werden können (Gibson und Skett 1994; Lewis 1996).

Bei Säugetieren konnten bis 1993 die Familien P450 1 bis P450 7, sowie P450 11, 17, 19, 21, 24 und 27 nachgewiesen werden. Vom P450 2 sind 9 Unterfamilien bekannt, vom P450 4 fand man 3, beim P450 11 konnte man 2 Untergruppen ermitteln. Weitere Isoenzyme konnten bei Vögeln, Fischen, Insekten, Pilzen, Pflanzen und Bakterien gefunden werden (Nelson et al. 1993; Lewis 1996). 1994 konnten bereits über 30 verschiedene P450-Subtypen beim Menschen nachgewiesen werden (Gibson und Skett 1994). Insgesamt kennt man heute mehrere hundert verschiedene P450-Isoenzyme bei verschiedenen Tieren, Vögeln, Fischen, Insekten, Pilzen, Pflanzen und Bakterien (Degtyarenko und Fábíán 2004).

Die Isoenzyme des P450 finden sich in verschiedenen Organen in unterschiedlichen Konzentrationen. Sie konnten in Leber, Niere, Lunge (Smith und Jones 1992; Ding und Kaminsky 2003), Darm (Kaminsky und Fasco 1992; Ding und Kaminsky 2003), Nebennieren, Hoden, Haut, Milz, Ovar, Plazenta (Pasanen und Pelkonen 1989; Du et al. 2004) und Gehirn (Strobel et al. 1997; 2001; Hedlund et al. 2001) nachgewiesen werden. Die mit Abstand höchste Konzentration findet sich bei allen Spezies in der Leber (Hietanen 1980).

Alle Isoenzyme funktionieren nach dem selben Prinzip (Lewis 1996; Marquardt und Schäfer 1997): Bei der Oxidation eines Substrats R-H wird dieses zunächst an das P450 gebunden. Das Eisen-Atom des Cytochroms befindet sich dabei im oxidierten (dreiwertigen) Zustand. Über eine Elektronentransferkette, die u.a. NADPH und ein Flavoprotein beinhaltet, wird unter Oxidation von NADPH ein Elektron auf das Eisenion übertragen, das nun zweiwertig ist. Es lagert sich molekularer Sauerstoff an und über eine zweite Transferkette wird ein weiteres Elektron aufgenommen. Schließlich zerfällt der entstandene Komplex unter Regeneration des Eisen-Atoms im P450 in das hydroxylierte Substrat R-OH und Wasser. Zusammenfassend ergibt sich:



**Abbildung 1:** Schema der Oxidation eines Substrates (RH) durch das Cytochrom P450 (nach Marquardt und Schäfer 1997).

Während des Reaktionszyklus am P450 kommt es zur Bildung von Superoxid-Anion-Radikalen ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) oder  $\text{H}_2\text{O}_2$ , das seinerseits in Radikale zerfällt. Wenn an das P450 ein Substrat gebunden hat, das diese aktivierten Sauerstoffatome nicht aufnimmt, werden vermehrt  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. daraus entstandene Radikale freigesetzt. Man bezeichnet das als Entkopplung des P450-Zyklus. Viele P450-Subtypen sind in der Lage, freie Radikale zu bilden (Wallace 1997), bei den P450-Isoenzymen 2B und 2E1 kommt es jedoch besonders häufig zu Entkopplungen (Goeptar et al. 1995). Typische Pharmaka, die eine Entkopplung des P450 auszulösen vermögen, sind z.B. Barbiturate.

Freie Radikale können Zellen schädigen und so an der Entstehung der verschiedensten Krankheiten beteiligt sein, wie z.B. der Ischämie-Reperfusions-Schädigung, der Arteriosklerose, der multiplen Sklerose, dem Morbus Parkinson, der rheumatoiden Arthritis u.a. (Halliwell und Gutteridge 1990; Kehrer 1993; Ignatowicz and Rybczynska 1994; Hogg 1998; Vendemiale et al. 1999; Cuzzocrea et al. 2001; Schiller et al. 2003). Freie Radikale können auch die DNS schädigen, was Mutagenität oder Kanzerogenität bewirken kann (Goldstein und Witz 1990; Dargel 1992; Behrend et al. 2003; Okada 2003).

Die zytotoxische Wirkung der freien Radikale hat andererseits auch positive Auswirkungen. So haben sie eine wichtige Funktion bei der Infektabwehr. Sie können durch

Lipidperoxidation Lipidmembranen schädigen, Proteine zerstören oder Enzyme blockieren, was Krankheitserreger abtöten oder in ihrer Virulenz abschwächen kann. Hier haben durch Leukozyten gebildeten Radikale eine besondere Bedeutung (Hurst und Barrette 1989; Guzik et al. 2003).

Die Bildung von freien Radikalen läuft während des P450-Zyklus sowie bei anderen Prozessen, z.B. in Mitochondrien oder Leukozyten, ständig ab (Lewis 1996). Um einer überschießenden Radikalbildung zu begegnen gibt es verschiedene Enzyme, die aktive Sauerstoff-Verbindungen neutralisieren können. Hier sind z.B. die Peroxidase, die Katalase, die Superoxid-Dismutase und die Glutathion-Reduktase zu nennen. Letztere kann unter NADPH-Verbrauch oxidiertes Glutathion wieder reduzieren. Verschiedene natürliche Nahrungsbestandteile, wie z.B. die Vitamine A, C und E, wirken als Antioxidantien (Biesalski und Frank 1995; Proteggente et al. 2002). Zwischen Radikalbildung und Radikalinaktivierung herrscht im gesunden Organismus ein Gleichgewicht (Urban et al. 1995; Biesalski 2002; Droge 2002).

### **3.3. Der Fettstoffwechsel**

Triglyzeride sind vorwiegend Energieträger, während Cholesterin ein Strukturmolekül der Zellmembranen sowie Ausgangsstoff für die Synthese von Steroidhormonen und Gallensäuren ist.

Da ein Transport der hydrophoben Lipide und des Cholesterins im Plasma in freier Form nicht möglich ist, werden sie an Lipoproteine gebunden, um ihre Wasserlöslichkeit zu erhöhen. Sie werden dabei von einer Schicht aus unverestertem Cholesterin und Phospholipiden umgeben. Die Lipoproteine haben auf ihrer Oberfläche Apolipoproteine, die die Synthese und den Katabolismus der Lipoproteine sowie die Aktivität von Enzymen regulieren können (Schwandt et al. 2004).

Nach ihrer physikalischen Dichte unterscheidet man Chylomikronen, very low density lipoproteins (VLDL), low density lipoproteins (LDL) und high density lipoproteins (HDL) (Classen et al. 1994; Schwandt et al. 2004; Tabelle 1).

Die durch die Enterozyten aufgenommenen Triglyzeride werden als Chylomikronen über die mesenteriale Lymphe dem Blutkreislauf zugeführt. Ein Großteil der in ihnen enthaltenen Triglyzeride wird nach Hydrolyse durch die Apolipoprotein-C-II-aktivierte Lipoproteinlipase bereits in den Kapillaren hydrolysiert, wodurch dem Fettgewebe und der Muskulatur Fettsäuren zur Verfügung gestellt werden. Die Apolipoproteine, die eine Aufnahme in die Leberzelle verhindern (C-I, C-II, C-III) gehen dabei auf HDL über. Der Verlust dieser

regulatorisch wirkenden Apolipoproteine beendet auch die Hydrolyse. Die Reste der Chylomikronen, auch als Remnants bezeichnet, binden über Apolipoprotein E an Rezeptoren der Hepatozyten, unter anderem auch an den LDL-Rezeptor, und werden endozytiert (Schwandt et al. 2004).

Von der Leber gebildete Triglyceride werden als VLDL in das Plasma abgegeben. Auch von ihnen wird ein großer Teil durch Lipoproteinlipasen hydrolysiert. Damit ist eine Veränderung des Apolipoprotein-Musters verbunden, was eine Bindung der Lipoproteine an die Rezeptoren der Hepatozyten ermöglicht und eine Aufnahme in die Leber zur Folge hat. Ein Teil von ihnen (ca. 40%) wird in cholesterinreiche, triglyzeridarme LDL umgewandelt. Diese versorgen die Gewebe mit Cholesterin. Ca. 70% von ihnen werden über LDL-Rezeptoren wieder in die Leber aufgenommen. LDL können mit Apolipoprotein A eine Verbindung eingehen, die als Lipoprotein A bezeichnet wird. Dieses Lipoprotein ist bei etwa 30% der Bevölkerung erhöht und ist mit einem erhöhtem Arterioskleroserisiko korreliert (Schwandt et al. 2004).

HDL bestehen aus scheibenförmigen Doppelmembranen, die von der Leber, aber auch vom Darm abgegeben werden. Sie nehmen Cholesterin aus extrahepatischen Geweben auf und transportieren es zur Leber zurück. Sie bilden sich in ihrer sphärischen Form erst durch die Aufnahme von Cholesterin aus extrahepatischen Geweben bzw. aus Phospholipiden und Cholesterin, das durch die Triglyzeridhydrolyse von Chylomikronen und VLDL entsteht (Schwandt et al. 2004).

**Tabelle 1:** Übersicht über die Lipoproteine (nach Classen et al. 1994)

<b>Lipo- protein- Klasse</b>	<b>Synthese- ort</b>	<b>Wesentliche Trans- portfunktion</b>	<b>Chole- sterin [%]</b>	<b>Trigly- zeride [%]</b>	<b>Anteil am Serum- Chole- sterin</b>	<b>Anteil an Serum- Trigly- zeriden</b>	<b>Apolipo- proteine</b>	<b>Erhöht bei Hyperli- popro- teinämie Typ:</b>
<b>Chylo- mikronen</b>	Darm	Lipide vom Darm in extra- hepatische Gewebe und zur Leber	3	90	nur post- prandial	nur post- prandial	B-48 C, E	I, III, V
<b>VLDL</b>	Leber	Lipide von der Leber in extrahepa- tische Gewebe	15	65	10	70	B-100 C, E	IIb, III, IV, V
<b>LDL</b>	aus VLDL	Cholesterin von der Leber in extra- hepatische Gewebe	45	10	65	20	B-100	IIa, IIb
<b>HDL</b>	Leber, Darm	Cholesterin aus extra- hepatischen Geweben zur Leber	20	5	25	10	A-I A-II C	

Eine Hyperlipidämie ist als erhöhte Konzentration von Cholesterin, Triglyceriden und Lipoproteinen bzw. Lipiden im Nüchternserum definiert (Müller-Wieland und Krone 2003; Schwandt et al. 2004). Nach Fredrickson werden phänotypisch 6 Typen erhöhter Chylomikronen-, VLDL- und LDL-Konzentrationen unterschieden (Tabelle 2). Diese Klassifikation gibt jedoch keine Auskunft über die Ätiologie der Hyperlipidämien oder über Veränderungen der HDL-Konzentration. In der allgemeinen Praxis werden 3 Kategorien der Hyperlipidämien unterschieden, die Hypercholesterinämie, die kombinierte/gemischte Hyperlipidämie und die Hypertriglyzeridämie. Hierbei werden wiederum primäre/genetisch bedingte von sekundären Plasmalipidveränderungen unterschieden. Es sind eine Vielzahl genetisch determinierter Hyperlipoproteinämien bekannt (Thiery und Teupser 1998; Müller-

Wieland und Krone 2003; Schwandt et al. 2004). Beispiele sind das Fehlen oder eine Verminderung der LDL-Rezeptoren, ein Defekt des Apolipoproteins B-100 sowie Genpolymorphismen des Lipoproteins (a), des Apolipoproteins E, der Lipoprotein-Lipase oder des Cholesterin-Transferproteins (CETP). Man bezeichnet diese familiären Stoffwechselstörungen auch als primäre Hyperlipoproteinämien. Sie können zu einer Erhöhung der Triglyzeride oder des Cholesterins oder von beidem führen.

Sekundäre Hyperlipidämien haben exogene Ursachen. Die sekundäre Hypertriglyzeridämie ist v.a. durch Adipositas, Alkohol und einen schlecht eingestellten Diabetes mellitus Typ 2 bedingt. Die sekundäre Hypercholesterinämie wird v.a. durch Fehlernährung, aber auch durch Pharmaka, wie z.B. Thiazide, hervorgerufen. Auch eine Schilddrüsenunterfunktion kann Ursache sein (Müller-Wieland und Krone 2003; Schwandt et al. 2004).

Die weitaus häufigste Form der Hypercholesterinämie ist die primäre Hypercholesterinämie. Sie ist ein wichtiger Risikofaktor für Arteriosklerose und koronare Herzkrankheit. Ihre Ätiologie ist bis heute nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich handelt es sich um die Summation vieler kleiner Abweichungen der Regelmechanismen des Cholesterinhaushaltes. Durch das Zusammenwirken endogener (genetischer) und exogener (Ernährung, Übergewicht, Alkoholkonsum) Faktoren kommt es zur Hypercholesterinämie. Es handelt sich somit um eine Kombination aus primärer und sekundärer Hyperlipoproteinämie. Man geht von einem 2- bis 3-fach erhöhten Risiko für die Entstehung einer koronaren Herzerkrankung aus. Diese Fettstoffwechselstörung ist oft mit Hypertriglyzeridämie, Hyperurikämie, Hypertonie und pathologischer Glukosetoleranz kombiniert und wird dann auch als metabolisches bzw. „Wohlstands“-Syndrom bezeichnet (Müller-Wieland und Krone 2003; Schwandt et al. 2004).



**Tabelle 2:** Einteilung der Hyperlipidämien nach Fredrickson (nach Herold 2002)

\*: intermediate density lipoproteins; N: normal; ↑: erhöht; ↑↑: stark erhöht.

Typ	I	IIa	IIb	III	IV	V
<b>Lipoproteine erhöht</b>	Chylomikronen	LDL	LDL + VLDL	IDL*	VLDL	VLDL + Chylomikronen
<b>Cholesterin</b>	N	↑	↑	↑	N-↑	N-↑
<b>Triglyceride</b>	↑↑	N	↑	↑	↑↑	↑↑
<b>Serum</b>	klar	klar	trüb	trüb	trüb	trüb
<b>Rahmschicht</b>	ja	nein	nein	nein	nein	ja
<b>Verteilung (%)</b>	sehr selten	10	15	5	70	selten

Wegen der großen Inzidenz und Prävalenz der Fettstoffwechselstörungen, sowie der hohen Letalität ihrer Folgekrankheiten (v.a. Herzinfarkt) hat die Forschung auf dem Gebiet der Cholesterin- und Triglyzeridsenkung und die Entwicklung neuer Medikamente große Bedeutung. Zur Zeit werden 6 verschiedene Substanzklassen eingesetzt, um in den Fettstoffwechsel regulierend einzugreifen (Müller-Wieland und Krone 2003):

*Ionenaustauscherharze* wie Cholestyramin und Cholestipol werden nicht resorbiert, binden Gallensäuren im Dünndarm und entziehen sie dem enterohepatischen Kreislauf. Zur Neusynthese der Gallensäuren wird Cholesterin verbraucht. Die Senkung der hepatischen Cholesterinkonzentration führt über eine vermehrte Expression von LDL-Rezeptoren zu einer Senkung des LDL- und Serumcholesterins um 20-30%. Typische Nebenwirkungen sind Obstipation und gastrointestinale Beschwerden. Auch ist eine Interaktion mit anderen Pharmaka sowie eine verminderte Resorption von fettlöslichen Vitaminen zu beachten.

*Nikotinsäure* und Nikotinsäurederivate vermindern die Synthese von VLDL, LDL-Cholesterin und Triglyzeriden. Als Nebenwirkungen können bei Therapiebeginn Flush und Juckreiz auftreten. Weiterhin finden sich gastrointestinale Beschwerden, eine Erhöhung der Transaminasen, eine Cholestase, ein Anstieg der Harnsäure oder eine Verschlechterung der Glukosetoleranz.

*Sitosterin* ist ein pflanzliches Cholesterin-Derivat, welches die enterale Cholesterinresorption und damit die Plasma-LDL-Konzentration vermindert. Es treten ebenfalls gastrointestinale Nebenwirkungen auf.

*Ezetimib* hemmt selektiv die intestinale Resorption von Cholesterin und Phytosterinen indem es an eine bisher noch unbekannte Struktur (Transporter?) in der Bürstensaummembran bindet und so die entsprechenden Resorptionsraten um 50% reduziert. Im Mittel wird der LDL-Cholesterinspiegel um 18% gesenkt. Weiterhin findet sich eine günstige Beeinflussung der Plasma-Triglyceride und des HDL-Cholesterins.

Die *Cholesterin-Synthese-Hemmer* (CSE-Hemmer), auch Statine genannt, hemmen das Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese, die Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase. Die Senkung der hepatischen Cholesterinkonzentration führt zu einer erhöhten Expression von LDL-Rezeptoren und damit zu einer vermehrten Aufnahme von LDL-Partikeln aus dem Blut in die Leberzellen. Sie können eine Reduktion des Cholesterins um bis zu 50% bewirken und sind somit zur Zeit die wirksamsten Substanzen zur Therapie der Hypercholesterinämie. Sie können neben gastrointestinalen Beschwerden auch eine Hepatitis, Sehstörungen, Blutbildveränderungen und eine Rhabdomyolyse hervorrufen. Auch eine Induktion verschiedener Isoenzyme des P450-Systems (z.B. P450 2B, 3A und 4A bei der Ratte) wurden beobachtet, wenn auch seltener wie bei den Fibraten, wie z.B. dem Ciprofibrat (Kocarek und Reddy 1996).

Alle bisher genannten Substanzen mit Ausnahme der Nikotinsäurederivate und der CSE-Hemmer verringern vor allem das Cholesterin. Die Triglyceride werden weniger beeinflusst. Welche Rolle ein erhöhter Triglyceridspiegel bei der Entstehung bzw. Progression von Krankheiten hat, ist noch nicht geklärt. Es ist aber bekannt, daß beim Diabetes mellitus extrem hohe Triglyceridspiegel auftreten und diese mit der Insulinresistenz zu korrelieren scheinen. So kann eine Senkung des Triglyceridspiegels die Insulinresistenz verbessern. Auch bei der Pankreatitis scheinen erhöhte Triglyceridspiegel eine Rolle zu spielen (Müller-Wieland und Krone 2003).

Eine weitere Substanzklasse, die *Fibrate*, ist in der Lage, sowohl den Cholesterin- als auch den Triglyceridstoffwechsel positiv zu beeinflussen. Auf die Fibrate soll im weiteren ausführlicher eingegangen werden, da die Untersuchung bereits als Arzneimittel zugelassener Fibrate sowie neu entwickelter Derivate dieser Wirkstoffe das Ziel dieser Arbeit war.

### **3.4. Fibrate und ihr Einfluß auf den Fettstoffwechsel**

Das erste Fibrat, die Clofibrinsäure, wurde bereits in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts als Medikament zur Senkung erhöhter Triglycerid- und Cholesterinspiegel eingesetzt (Miller und Spence 1998). Alle heute verwendeten Fibrate sind Abkömmlinge der Clofibrinsäure und steigern die Aktivität der Lipoproteinlipase, wodurch VLDL vermehrt in LDL umgebaut werden. Sie sind in der Lage, die Plasmaspiegel von HDL und VLDL, sekundär auch den der LDL, positiv zu beeinflussen. Während einer Therapie mit den bisher zugelassenen Fibraten (z.B. Clofibrat, Etofyllinclofibrat, Bezafibrat, Etofibrat, Fenofibrat, Gemfibrozil) steigt die Konzentration der HDL an, die Plasmaspiegel von LDL und Triglyceriden sinken (Miller und Spence 1998; Chapman 2003; UK HDL-C Consensus Group 2004). Die LDL/HDL-Ratio wird dabei als wichtiges Prognose-Kriterium für die Entstehung oder Progredienz einer Arteriosklerose angesehen. Sie sollte kleiner 4 sein.

In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, daß Fibrate das Risiko der Entstehung einer koronaren Herzerkrankung vermindern können. So konnten Frick et al. 1987 in einer placebo-kontrollierten Studie an Patienten mit hohen VLDL- und LDL-Cholesterinkonzentrationen nachweisen, daß die Therapie mit Gemfibrozil die Häufigkeit von Herzerkrankungen senkt. Gleiche Ergebnisse erbrachte eine sekundäre Preventionsstudie an Männern mit erniedrigtem Serum-HDL-Cholesterin (Rubins 1998). Fenofibrat senkt die Serum-LDL-Cholesterinkonzentration wirksamer als Clofibrat oder Gemfibrozil (Knopp et al. 1998).

Schon 1965 zeigten Hess et al. eine Proliferation der Peroxisomen bei Rattenlebern durch Clofibrat. In den folgenden Jahren ergaben viele Untersuchungen, daß Fibrate sowohl peroxisomale als auch mikrosomale Enzyme induzieren, was bei längerer Therapie zur Hepatomegalie führt. Feller et al. wiesen 1987 eine Proliferation der Peroxisomen in Ratten-Leberzellkulturen nach. Duclos et al. untersuchten 1997 die Wirkung von Fibraten auf Leberzellkulturen von Ratten und Menschen. Sie fanden ebenfalls eine Proliferation der Peroxisomen sowie morphologische Veränderungen der Leberzellen, die einer Peroxisomen-Proliferation entsprachen.

Auch eine Induktion maligner Tumore durch Fibrate wird diskutiert. In hohen Dosen können Fibrate bei Ratten Lebertumore erzeugen, die auf die Peroxisomenproliferation zurückzuführen sind (Reddy et al. 1980; Reddy und Lalwani 1983). Dieser Effekt konnte bis jetzt nur bei kleinen Nagern festgestellt werden. Eine kanzerogene Wirkung bei anderen Tieren oder beim Menschen wurde bisher nicht beobachtet (Reddy et al. 1984; Lake et al. 1989; 2000; Makowska et al. 1991; 1992; Graham et al. 1994; Rodriguez et al. 2000).

Die Proliferation der Peroxisomen erklärt einige Nebenwirkungen der Fibrate (v.a. Hepatomegalie, Transaminasenanstieg), aber auch ihre Wirkungen (Etgen und Mantlo 2003; Cornwell et al. 2004). Fibrate ahmen die natürlichen Liganden der „peroxisome proliferator activated receptors“ nach und modulieren so die Expression verschiedener Gene, die Lipoproteine und Lipoprotein-metabolisierende Enzyme sowie Apolipoproteine kodieren (Etgen und Mantlo 2003; Cornwell et al. 2004). So werden die Plasmaspiegel von Lipoproteinen verändert. Eine Reihe von Studien zeigte, daß ein erniedrigter HDL-Plasmaspiegel mit einem erhöhtem Risiko an Arteriosklerose und koronarer Herzkrankheit zu erkranken, einhergeht (Gordon und Rifkind 1989). Fibrate erhöhen, wie bereits erwähnt, die Plasmakonzentration von HDL und wirken somit als protektiver Faktor bei Arteriosklerose.

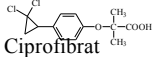
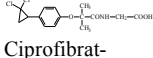
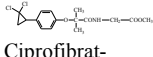
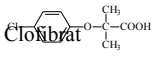
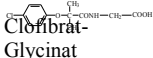
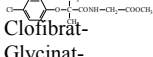
Eine Interaktion mit den mikrosomalen Enzymen, v.a. dem P450 ist für die Wirkung der Fibrate nicht zwingend erforderlich, sondern eher eine Folge ihrer Metabolisierung. Die Phase-1-Biotransformation der Fibrate erfolgt dabei hauptsächlich über die P450 3A-Familie, so daß Interaktionen vor allem mit Substanzen auftreten, die ebenfalls über diese Enzyme verstoffwechselt werden oder diese beeinflussen, wie z.B. Statine, Cyclosporin, orale Antidiabetika, Grapefruitsaft oder Erythromycin (Lozada und Dujovne 1994; Bays und Dujovne 1998; Miller und Spence 1998). Es wäre also möglich, eine Substanz zu entwickeln, die die positiven Eigenschaften der Fibrate auf die Lipoproteine besitzt, ohne wesentlich mit mikrosomalen Enzymen zu interagieren. Die Nebenwirkungen wären somit geringer.

Eine weitere wichtige unerwünschte Wirkung der Fibrate ist die Rhabdomyolyse, die durch die CSE-Hemmer ebenfalls ausgelöst werden kann. Dies ist auch der Grund, warum beide Substanzgruppen nicht kombiniert werden sollten. Kommt es zu einer Erhöhung des Plasmaspiegels der Substanzen, steigt die Wahrscheinlichkeit, daß diese gefährliche Nebenwirkung auftritt (Hodel 2002; Finsterer 2003; Matzno et al. 2003). So führte die Kombination von Cerivastatin (LIPOBAY®) und Gemfibrozil gehäuft zu Todesfällen, die Folge der Rhabdomyolyse mit sekundärem Nierenversagen waren. Ursache ist eine durch Gemfibrozil gestörte Biotransformation des Cerivastatins. Beide Substanzen werden unter anderem mit Hilfe des P450 3A4 verstoffwechselt. Das gehäufte Auftreten der Rhabdomyolyse führte dazu, daß Cerivastatin als Arzneimittel nicht mehr verfügbar ist. Das zeigt, wie wichtig es ist, Arzneimittel zu entwickeln, die eine möglichst geringe Interaktion mit dem P450 aufweisen. Ein Teil dieser Arbeit untersucht den Einfluß neu synthetisierter Fibrat-Derivate auf die verschiedenen Isoenzyme des P450 in vitro.

Vom Institut für Pharmazie der FSU Jena wurden Glycinat- und Glycinat-Methylester-Verbindungen der Substanzen Ciprofibrat, Clofibrat, Bezafibrat, Fenofibrat und Gemfibrozil

synthetisiert. Wie bereits erwähnt, ist die Konjugation mit Glycin eine häufige Phase-2-Biotransformations-Reaktion. Eine Kopplung von Aminosäuren an Fibrate wird jedoch in vivo sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte nicht beobachtet (Oelschläger et al. 2003). Alle Fibrat-Derivate und „Muttersubstanzen“ wurden hinsichtlich ihrer Interaktionen mit der Monooxygenasefunktion des P450 und in Bezug auf mögliche prooxidative oder antioxidative Eigenschaften untersucht. Eine Übersicht über die Substanzen liefert die Tabelle 3:

**Tabelle 3:** Molekulargewichte (MG), Summen- und Strukturformeln der untersuchten Substanzen.

Substanz	Summenformel	MG	Strukturformel
 Ciprofibrat	$C_{13}H_{14}O_3Cl_2$	289,13	
 Ciprofibrat-Glycinat	$C_{15}H_{17}O_4NCl_2$	346,19	
 Ciprofibrat-Glycinat-Methylester	$C_{16}H_{19}O_4NCl_2$	360,22	
 Clofibrat	$C_{10}H_{11}O_3Cl$	214,64	
 Clofibrat-Glycinat	$C_{12}H_{14}O_4NCl$	271,70	
 Clofibrat-Glycinat-Methylester	$C_{13}H_{16}O_4NCl$	285,71	

Substanz	Summenformel	MG	Strukturformel
 <b>Bezafibrat</b>	$C_{19}H_{20}O_4NCl$	361,80	
 <b>Bezafibrat-Glycinat</b>	$C_{21}H_{23}O_5N_2Cl$	418,85	
 <b>Bezafibrat-Glycinat-Methylester</b>	$C_{22}H_{25}O_5N_2Cl$	432,88	
 <b>Fenofibrat</b>	$C_{17}H_{15}O_4Cl$	318,74	
 <b>Fenofibrat-Glycinat</b>	$C_{19}H_{19}O_5NCl$	375,79	
 <b>Fenofibrat-Glycinat-Methylester</b>	$C_{20}H_{20}O_5NCl$	389,81	
 <b>Gemfibrozil</b>	$C_{15}H_{22}O_3$	250,32	
 <b>Gemfibrozil-Glycinat</b>	$C_{17}H_{25}O_4N$	307,39	
 <b>Gemfibrozil-Glycinat-Methylester</b>	$C_{18}H_{27}O_4N$	321,40	

#### 4. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit sollten zehn neu am Institut für Pharmazie der FSU Jena entwickelte Fibrat-Derivate (Ciprofibrat-Glycinat, Ciprofibrat-Glycinat-Methylester, Clofibrat-Glycinat, Clofibrat-Glycinat-Methylester, Bezafibrat-Glycinat, Bezafibrat-Glycinat-Methylester, Fenofibrat-Glycinat, Fenofibrat-Glycinat-Methylester, Gemfibrozil-Glycinat und Gemfibrozil-Glycinat-Methylester) in vitro mit den bereits bekannten Substanzen Ciprofibrat, Clofibrat, Bezafibrat, Fenofibrat und Gemfibrozil in ihrer Wirkung auf die Monooxygenase-Funktion des P450 und hinsichtlich möglicher pro- oder antioxidativer Eigenschaften untersucht werden.

Mit der Ermittlung des spektralen Bindungsverhaltens galt es zunächst herauszufinden, ob die zu testenden Substanzen eine Bindung mit dem P450 eingehen.

Weiterhin sollte geprüft werden, wie sich die Fibrat-Derivate auf die Monooxygenasefunktion des P450 auswirken. Zudem war abzuschätzen, welche P450-Subtypen beeinflusst werden. So lassen sich Rückschlüsse ziehen, bei welchen P450-Isoformen mit Interaktionen zu rechnen ist. Hierzu wurden folgende Modellreaktionen durchgeführt, die jeweils für bestimmte Isoenzyme des P450 charakteristisch sind: die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (P450 1A), die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (P450 1A, 2A, 2B, 2C), die Pentoxyresorufin-O-Depentylierung (P450 2B), die p-Nitrophenol-Hydroxylierung (P450 2E1), die Ethylmorphin-N-Demethylierung (P450 3A) und die  $\omega$ -Laurinsäure-Hydroxylierung (P450 4A).

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Wirkung der neu synthetisierten Fibrat-Derivate auf die Oxidasefunktion des P450 getestet und mit den Ergebnissen der „Muttersubstanzen“ verglichen werden. Es galt herauszufinden, ob die Substanzen als Entkoppler des oxidativen Zyklus auftreten bzw. prooxidative Eigenschaften haben oder ob sie in der Lage sind, die Radikalbildung zu vermindern (antioxidative Eigenschaften). Für den Fall antioxidativer Effekte war die Frage zu beantworten, ob die Ursache auf einer Wechselwirkung mit dem P450 beruht oder ob es sich um „echte“ Scavenger-Eigenschaften der Substanz handelt.

Es wurden als Modellreaktionen die Wasserstoffperoxid-Bildung, die  $\text{Fe}^{2+}$ - und NADPH-stimulierte Lipidperoxidation sowie die Luminol- und die Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz in Lebermikrosomen durchgeführt. Diese Reaktionen messen die Bildung von Radikalen, die durch den Reaktionszyklus des P450 entstehen. So können evtl. vorhandene antioxidative Eigenschaften der Substanzen oder auch prooxidative Wirkungen festgestellt werden.

Eine Verminderung der Radikale im Inkubationsansatz kann bei diesen Oxidase-Modellreaktionen zwei Ursachen haben. Zum einen könnten die Fibrate den Reaktionszyklus des P450 beeinflussen, sie könnten aber auch selber in der Lage sein, Radikale zu neutralisieren. Die Vollblut-Chemilumineszenz mißt Radikale, die bei der Phagozytose durch Leukozyten freigesetzt werden, also unabhängig vom Zyklus des P450 entstehen. Hierbei ist vor allem die NADPH-Oxidase beteiligt. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, „echte“ Scavenger-Eigenschaften als Ursache einer verminderten Radikalbildung zu verifizieren, wenn sowohl bei dieser wie auch bei den anderen Modellreaktionen eine Hemmung zu beobachten ist. Es besteht aber die, wenn auch unwahrscheinliche Möglichkeit, daß eine Substanz sowohl das P450 als auch die NADPH-Oxidase hemmt.

Die Ursache für eine, im Vergleich zur Kontrolle, vermehrte Radikalbildung im Inkubationsansatz, könnte darin liegen, daß die zugesetzten Substanzen in der Lage sind, den oxidativen Zyklus des P450 zu entkoppeln. Solche Entkoppler können theoretisch zusätzlich auch Scavenger-Eigenschaften haben. Das Ergebnis der Modellreaktionen spiegelt nur den Summationseffekt wider.



## **5. MATERIAL UND METHODEN**

### **5.1. Versuchstiere**

Es wurden 60-80 Tage alte männliche Han:Wistar Ratten aus der institutseigenen Zucht verwendet. Die Tiere waren unbehandelt und wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten (ca. 50% Luftfeuchtigkeit, 20-24°C Raumtemperatur, 12/12h Hell-Dunkel-Rhythmus). Sie wurden mit Standardfutter (Altromin 1316) ernährt und erhielten Wasser ad libitum.

### **5.2. Materialgewinnung**

Die Ratten wurden mit Ether narkotisiert, dekapitiert und entblutet. Die Lebern wurden herauspräpariert und gewogen.

#### **5.2.1. Herstellung des 9000g-Überstandes**

Ein Teil Leber wurde mit zwei Teilen 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4 (Na-P-Puffer), homogenisiert und anschließend in einer Kühlzentrifuge (Zentrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 4°C und 9000g 20 Minuten lang zentrifugiert (Matsubara et al. 1976).

#### **5.2.2. Herstellung der Mikrosomen**

Es wurde ein 9000g-Überstand hergestellt und dieser mit 25 mM  $MgCl_2$ -Lösung im Verhältnis 1 + 2,5 gemischt und nochmals 20 Minuten bei 9000g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert (Zentrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das entstandene Sediment wurde anschließend mit 0,1 M Na-P-Puffer rehomogenisiert und nochmals mit 9000g bei gleicher Temperatur 40 Minuten mit der selben Zentrifuge zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde wiederum mit 0,1 M Na-P-Puffer rehomogenisiert (Silman et al. 1965).

#### **5.2.3. Bestimmung des Proteingehaltes**

Die Bestimmung des Proteingehaltes der 9000g-Überstände sowie der Mikrosomen erfolgte durch die durch Klinger und Müller (1974) modifizierte Biuret-Reaktion. Das Prinzip beruht darauf, daß Proteine mit Kupfersulfat im alkalischen Milieu blauviolett gefärbte Komplexe

bilden. Die Intensität der Färbung läßt sich mit einem Spektralphotometer messen und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der untersuchten Lösung.

Für die Hauptwerte wurden 0,25 ml 1:4 verdünnter 9000g-Überstand bzw. Mikrosomensuspension mit 0,25 ml 5%iger Na-Desoxycholatlösung 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde 4,5 ml Biuret-Reagenz hinzugefügt. Für jede Probe wurde ein Trübungswert mitgeführt, der statt des Biuret-Reagenz 4,5 ml 3%ige NaOH enthielt. Für die Haupt- und Trübungswerte wurden jeweils Leerwerte angefertigt. Die Leerwerte und Trübungswerte enthielten anstelle von 0,25 ml Überstand 0,25 ml 0,1 M Na-P-Puffer und wurden sonst gleichermaßen wie die Hauptwerte bzw. Trübungswerte behandelt. Nach 30 Minuten wurde an einem Spektralphotometer (Spekol 11, Carl Zeiss, Jena, Deutschland), bei einer Wellenlänge von 546 nm und einer Schichtdicke von 1 cm die Extinktion gegen die Leerwerte bestimmt.

Als Bezugsgröße wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin mit 10 verschiedenen Protein-Konzentrationen (0,5 bis 5 mg/0,25 ml) sowie mit einem Leerwert angefertigt. Die Proteinlösungen wurden anstelle des 9000g-Überstandes bzw. der Mikrosomen zugegeben. Die Extinktionen wurden wieder gegen den Leerwert ermittelt. Für alle 10 Rinderserumalbuminlösungen wurde ein Faktor (Konzentration des Proteins in der Lösung / Extinktion) errechnet. Der Mittelwert dieser Faktoren ergab den Faktor der Eichkurve.

Der Proteingehalt wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Protein [mg/ml]} = (\text{Ext.}_{\text{Biuret}} - \text{Ext.}_{\text{NaOH}}) \cdot F_{\text{EK}} \cdot 16$$

Ext.<sub>Biuret</sub> = Extinktion der Hauptwerte

Ext.<sub>NaOH</sub> = Extinktion der Trübungswerte

F<sub>EK</sub> = Faktor der Eichkurve

16 = Verdünnungsfaktor

### **5.3. Spektrales Bindungsverhalten an das Cytochrom P450**

Die Bestimmung des spektralen Bindungsverhaltens an das P450 wurde mit Hilfe der Methode nach Müller (1976) in Anlehnung an die Erstbeschreibung von Schenkman et al. (1967) durchgeführt.

Im Differenzspektrum werden Extinktionsminima und -maxima in einem Wellenlängenbereich von 350 bis 450 nm gemessen. Es werden Mikrosomensuspensionen mit einer evtl. P450-bindenden Substanz mit Mikrosomensuspensionen ohne Zusatz gegeneinander

verglichen. Die Kurvenverläufe werden in 2 Typen unterteilt. Der Typ 1 entspricht der Bindung von Hexobarbital an das P450. Es besitzt ein Extinktionsmaximum bei 385 nm und ein Extinktionsminimum bei 425 nm. Der Typ 2 entspricht der Bindung von Anilin an das P450. Es kommt zu einem Extinktionsmaximum bei einer Wellenlänge von 427 nm und zu einem Minimum bei 392 nm. Anilin und Hexobarbital wurden immer als Kontrollen mitgeführt.

In den Hauptstrahlengang kamen 1 ml Mikrosomensuspension und 0,1 ml Hexobarbital bzw. Anilinlösung (Endkonzentration 1 mM) oder 0,1 ml der in Methanol gelösten zu testenden Substanz (1 mM). In den Vergleichsstrahlengang kamen 1 ml Mikrosomensuspension und 0,1 ml Methanol. Bei einer Schichtdicke von 0,5 cm wurde zwischen den Wellenlängen 350 und 450 nm mit dem Meßgerät Unicam UV/VIS 4 (Spectronics, Cambridge, UK) ein Differenzspektrum aufgenommen.

#### **5.4. Monooxygenase-Modellreaktionen**

Es wurden die Modellreaktionen Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD), Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD), Pentoxyresorufin-O-Depentylierung (PROD), p-Nitrophenol-Hydroxylierung (p-NPH), Ethylmorphin-N-Demethylierung (ENDM) und  $\omega$ -Laurinsäure-Hydroxylierung (LAOH) im 9000g-Überstand durchgeführt.

Bei der EROD, der ECOD und der ENDM, wurden zunächst verschiedene Substratkonzentrationen eingesetzt, was eine Darstellung nach Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk ermöglicht. Dadurch kann der Hemmtyp der untersuchten Substanzen (kompetitiv, nicht kompetitiv oder Mischtyp) ermittelt werden. Nach dieser Methode wurden die Substanzen Ciprofibrat und Clofibrat, deren Glycinat-Methylester-Verbindungen sowie Ciprofibrat-Glycinat untersucht. Da diese Substanzen nur bei hohen Konzentrationen die entsprechenden Enzyme des P450 hemmten, lagen die Kurven sehr dicht beieinander. Aussagen über den Hemmtyp waren aus diesem Grunde nur eingeschränkt möglich. Bei der Untersuchung von Clofibrat-Glycinat und von Fenofibrat, Bezafibrat, Gemfibrozil und deren Glycinat- bzw. Glycinat-Methylester-Verbindungen wurde deshalb in Erwartung ähnlicher Ergebnisse und aus ökonomischen Gründen nur noch mit einer Substratkonzentration gearbeitet. Ebenso wurde bei den Modellreaktionen EROD, PROD, p-NPH sowie bei der LAOH nur eine Substratkonzentration verwendet.

Die Fibrate wurden bei allen Reaktionen in 4 verschiedenen Konzentrationen (1, 10, 100 und 1000  $\mu$ M) zugesetzt. Es wurden jeweils Kontrollen mit und ohne dem Lösungsmittel Methanol mitgeführt.

#### 5.4.1. Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD)

Die Bestimmung der EROD-Aktivität wurde in Anlehnung an Pohl und Fouts (1980) durchgeführt. In Anwesenheit von Sauerstoff, NADPH, Glucose-6-Phosphat (G-6-P) und  $\text{MgCl}_2$  entsteht durch Deethylierung aus Ethoxyresorufin Resorufin (Reso), das aufgrund seiner ausgeprägten Fluoreszenz in sehr kleinen Konzentrationen nachweisbar ist.

Das entstandene Resorufin ist hauptsächlich ein Maß für die Aktivität der P450-Subfamilie 1A, vor allem des Isoenzym 1A1. Die quantitative Bestimmung erfolgt mit einem Spektralfluorimeter.

Bei fünf der durchgeführten Versuchsserien wurde das Ethoxyresorufin in verschiedenen Konzentrationen (0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) zugegeben, um eine Darstellung nach Michaelis-Menten zu ermöglichen. Bei den restlichen Untersuchungen wurde nur noch die höchste Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt. Mit den zu testenden Substanzen wurde eine Verdünnungsreihe (1, 10, 100, 1000  $\mu\text{M}$ ) hergestellt. Es wurden Kontrollen mit und ohne Methanol sowie Leerwerte angefertigt. Das Ethoxyresorufin und die zu testenden Fibrate wurden in Methanol gelöst. Das Lösungsmittel wurde bei 90°C verdampft. In den Inkubationsansatz kamen folgende Substanzen:

- 0,1 ml 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,
- 0,1 ml 0,1 M  $\text{MgCl}_2$ , gelöst in aqua destillata (a.d.),
- 0,1 ml 25 mM G-6-P, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,
- 0,1 ml 2,5 mM NADPH, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 ml 1:10 mit 0,1 ml 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4, verdünntem 9000g-Überstand gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C unter Schütteln im Wasserbad. Nach 5 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml eisgekühltem Methanol gestoppt. Alle Proben wurden dann bei 5000g 10 min zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland) und danach mit einem Spektralfluorimeter (F2000, Hitachi, Kyoto, Japan) bei einer Exzitationswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 585 nm gemessen.

Zu jeder Versuchsreihe wurde eine Eichkurve mit Resorufin in verschiedenen Konzentrationen (0, 1, 2, 4, 8  $\mu\text{M}$ ) erstellt. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels Methanol erfolgte die Zugabe von 0,5 ml 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4, und 1,0 ml Methanol. Es wurden keine Kofaktoren und kein 9000g-Überstand zugesetzt.

Die Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$A_{\text{Reso}} = \frac{\Delta I \cdot F_{\text{EK}} \cdot F_{\text{V}}}{\text{Prot.} \cdot t}$$

$A_{\text{Reso}}$	= Enzymaktivität [pmol/(mg Prot.*min)]
$\Delta I$	= Differenz der Emissionen der Haupt- und Leerwerte
$F_{\text{EK}}$	= Faktor der Eichkurve
$F_{\text{V}}$	= Verdünnungsfaktor
Prot.	= Proteingehalt des 9000g-Überstandes [mg/ml]
t	= Inkubationszeit (5 min)

#### 5.4.2. Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD)

Die Bestimmung der ECOD wurde nach der Methode von Aitio (1978) durchgeführt. Bei dieser Modellreaktion findet an der Ethylgruppe von 7-Ethoxycoumarin eine P450-abhängige C-Hydroxylierung statt. Anschließend kommt es zur nichtenzymatischen Abspaltung von Acetaldehyd und es entsteht 7-Hydroxycoumarin, das im alkalischen Milieu bei einer Exzitationswellenlänge von 375 nm und einer Emissionswellenlänge von 454 nm fluorimetrisch bestimmt wird. Durch die ECOD läßt sich vorwiegend die Aktivität der P450-Subtypen 1A, 2A, 2B und 2C nachweisen.

Das methodische Vorgehen entspricht dem der Messung der EROD. Für die zu testenden Substanzen wurden Verdünnungsreihen (1, 10, 100, 1000 µM) mit Methanol hergestellt. In die Reagenzgläser kamen 0,1 ml der verdünnten Substanz. Der Kontrolle wurde stattdessen 0,1 ml Methanol zugegeben. Auch bei dieser Modellreaktion wurde bei fünf Fibraten für das Ethoxycoumarin eine Verdünnungsreihe mit Methanol mit folgenden Endkonzentrationen angelegt: 0, 12,5, 25, 50, 100, 200 und 400 µM. Bei den übrigen Versuchen wurde nur mit der höchsten Konzentration (400 µM) gearbeitet. Die Leerwerte enthielten ebenfalls Ethoxycoumarin. Der Eichkurve wurden verschiedene Konzentrationen von 7-Hydroxycoumarin (7-OH-C) (0, 0,5, 1, 2, 4 mM) und dafür kein Ethoxycoumarin zugegeben. Die Ethoxycoumarin- und die Fibrat-Derivate-enthaltenden Reagenzgläser wurden auf 90°C erhitzt, um das Lösungsmittel Methanol zu verdampfen.

Anschließend kam in alle Röhrchen (Inkubationsansätze, sowie Kontrollen und Leerwerte)

- 0,1ml 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,
- 0,1 ml 2,5 mM NADPH, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,
- 0,1 ml 25 mM G-6-P, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,
- 0,1 ml 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, gelöst in a.d..

Die Enzymreaktion wurde mit 0,1 ml 1:10 verdünntem 9000g-Überstand gestartet und nach 10 Minuten mit 0,5 ml 0,31 M Trichloressigsäure (TCA) gestoppt. Während der Inkubation befanden sich die Proben in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C und wurden geschüttelt. Den Leerwerten und der Eichkurve wurde die TCA vor dem 9000g-Überstand zugesetzt. Sie wurden nicht inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion wurden alle Proben mit 4 ml 0,05 M NaOH alkalisiert. Gemessen wurde an einem Fluoreszenzphotometer (F2000, Hitachi, Kyoto, Japan) bei einer Exzitationswellenlänge von 375 nm und einer Emissionswellenlänge von 454 nm. Die Enzymaktivität wurde wie folgt berechnet:

$$A_{7\text{-OH-C}} = \frac{\Delta I \cdot F_{EK}}{162 \cdot \text{Prot.} \cdot t}$$

$A_{7\text{-OH-C}}$	= Enzymaktivität [pmol/(mg Protein*min)]
$\Delta I$	= Differenz der gemessenen Fluoreszenz der Proben und der Leerwerte
$F_{EK}$	= Faktor der Eichkurve
Prot.	= Proteingehalt des 9000g-Überstandes [mg/ml]
162	= Molekulargewicht des 7-OH-C [g/mol]
t	= Inkubationszeit (10 min)

#### 5.4.3. Pentoxyresorufin-O-Depentylierung (PROD)

Bei der PROD entsteht in Anwesenheit von NADPH, G-6-P,  $\text{MgCl}_2$  und Sauerstoff durch Depentylierung des 7-Pentoxyresorufins Resorufin, welches mit dem Spektralfluorimeter gemessen werden kann (Lubet et al. 1985). Mit dieser Methode wird vorwiegend die Aktivität der P450 2B-Familie gemessen.

Der Versuchsablauf ist analog der Messung der EROD. Da die Leerwerte bei der PROD sehr hoch sind, wurde diese Modellreaktion mit Leber-9000g-Überstand von mit Phenobarbital behandelten Ratten durchgeführt. Die Tiere erhielten einmalig 50 mg Phenobarbital pro kg Körpergewicht und wurden 48 Stunden später zur Organentnahme getötet. Aufgrund der trotzdem hohen Schwankungsbreite der Ergebnisse dieser Methode wurde nur mit der höchsten Substratkonzentration (500  $\mu\text{M}$ ) gearbeitet und auf eine Michaelis-Menten-Darstellung verzichtet. Es wurden dafür Doppelbestimmungen angefertigt.

Die zu testenden Fibrate wurden in Methanol gelöst und auf folgende Endkonzentrationen verdünnt: 1, 10, 100 und 1000  $\mu\text{M}$ . Es wurden Kontrollwerte mit und ohne Methanol sowie Leerwerte mitgeführt. Die verdünnten Fibrate wurden in die entsprechenden Reagenzgläser

pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,1 ml 500 µM 7-Pentoxoresorufin, welches ebenfalls in Methanol gelöst war, in alle Proben, auch in die Kontrollen und Leerwerte. Für jeden Versuch wurde eine Eichkurve mit in Methanol gelöstem Resorufin (0, 1, 2, 4 und 8 µM) angefertigt. Das Lösungsmittel wurde bei 90°C im Wasserbad verdampft.

In den Inkubationsansatz kamen weiterhin folgende Substanzen:

0,1 ml 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,

0,1 ml 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, gelöst in a.d.,

0,1 ml 25 mM G-6-P, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,

0,1 ml 1:10 mit 0,1 M Na-P-Puffer (pH 7,4) verdünnter 9000g-Überstand.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 ml 2,5 mM NADPH gestartet und nach 10 Minuten mit 1 ml eisgekühltem Methanol gestoppt. Während der Inkubation standen die Proben bei 37°C im Wasserbad und wurden geschüttelt.

Der Eichkurve wurde statt den Kofaktoren und des Überstandes 0,5 ml 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4, und 1 ml Methanol zugesetzt.

Nach der Inkubation wurden alle Proben 10 Minuten bei 5000g zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland) und anschließend mit einem Spektralfluorimeter (F2000, Hitachi, Kyoto, Japan) bei einer Anregungswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 585 nm gemessen.

Die Berechnung erfolgte analog der EROD nach folgender Formel:

$$A_{\text{Reso}} = \frac{\Delta I * F_{\text{EK}} * F_{\text{V}}}{\text{Prot.} * t}$$

$A_{\text{Reso}}$  = Enzymaktivität [pmol/(mg Protein\*min)]

$\Delta I$  = Differenz der Emissionen der Haupt- und Leerwerte

$F_{\text{EK}}$  = Faktor der Eichkurve

$F_{\text{V}}$  = Verdünnungsfaktor

Prot. = Proteingehalt des 9000g-Überstandes [mg/ml]

t = Inkubationszeit (10 min)

#### 5.4.4. p-Nitrophenol-Hydroxylierung (p-NPH)

Bei dieser Modellreaktion wurde nur mit einer Substratkonzentration gearbeitet. Das P450-Isoenzym 2E1 katalysiert hier die Hydroxylierung von p-Nitrophenol, wobei ein roter Farbstoff (4-Nitrobrenzcatechin) entsteht, der spektralphotometrisch gemessen wird. Die Methode wurde nach Chang et al. (1997) durchgeführt. Die Fibrat wurden mit Methanol verdünnt (1, 10, 100, 1000  $\mu$ M) und in die entsprechenden Reagenzgläser pipettiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel bei 90°C im Wasserbad verdampft.

Folgende Substanzen wurden danach hinzugefügt:

- 10  $\mu$ l 4 mM p-Nitrophenol,
- 335  $\mu$ l 50 mM Na-P-Puffer, pH 7,4,
- 25  $\mu$ l 66 mM G-6-P, gelöst in a.d.,
- 25  $\mu$ l 66 mM  $MgCl_2$ , gelöst in 0,1 M Na-Puffer, pH 7,4,
- 80  $\mu$ l unverdünnter 9000g-Überstand.

Durch Zugabe von 25  $\mu$ l 26 mM in 0,1 M Na-P-Puffer (pH 7,4) gelöstem NADPH wurde die Reaktion gestartet. Die Proben wurden bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Nach 60 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml 20%iger TCA gestoppt. Zu jedem 9000g-Leberüberstand wurden Leerwerte mitgeführt, die alle Substanzen der Hauptwerte enthielten. Sie wurden jedoch vor Zugabe des NADPH mit TCA inaktiviert und nicht inkubiert.

Die Eichwerte enthielten ebenfalls alle Substanzen der Hauptwerte. Anstelle des p-Nitrophenols wurde jedoch 4-Nitrobrenzcatechin in verschiedenen Konzentrationen zugegeben (0, 10, 20, 40, 80  $\mu$ M) sowie der 9000g-Leberüberstand durch 80  $\mu$ l Na-P-Puffer, pH 7,4, ersetzt. Sie wurden ebenfalls nicht inkubiert.

Anschließend wurden alle Reagenzgläser 10 Minuten bei 5000g zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland). Danach wurden 0,5 ml des Überstandes abpipettiert und mit 0,25 ml 2 M NaOH versetzt. Zum Schluß wurde mit dem Spekol 11 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 535 nm und einer Schichtdicke von 1 cm die Extinktion gegen a.d. gemessen.

Die Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

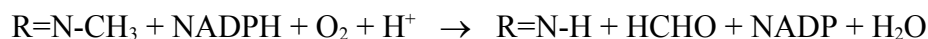
$$A_{p-NPH} = \frac{\Delta E * F_{EK}}{\text{Prot.} * t}$$



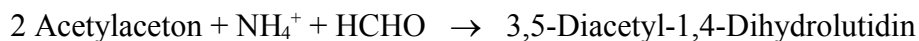
$A_{p-NPH}$	= Enzymaktivität [nmol/(mg Protein*min)]
$\Delta E$	= Differenz der Extinktionen der Hauptwert- und Leerwerte
$F_{EK}$	= Faktor der Eichkurve
Prot.	= Proteingehalt des 9000g-Überstandes [mg/ml]
t	= Inkubationszeit (60 min)

#### 5.4.5. Ethylmorphin-N-Demethylierung (ENDM)

Bei der Ethylmorphin-N-Demethylierung im 9000g-Überstand findet P450-abhängig eine C-Hydroxylierung an der N-Methylgruppe von Ethylmorphin statt. Anschließend kommt es zur nichtenzymatischen Abspaltung von Formaldehyd (Klinger und Müller 1977; Kleeberg und Klinger 1982):



In einer darauf folgenden Farbreaktion reagiert das Formaldehyd mit Acetylaceton und einem Ammoniumion zu 3,5-Diacetyl-1,4-Dihydrolutidin, das aufgrund seiner gelben Farbe mit einem Spektralphotometer nachgewiesen werden kann (Reaktion nach Nash 1953):



Die ENDM ist vorwiegend eine Modellreaktion für den Nachweis der Aktivität von P450 3A. Liu et al. zeigten 1995, daß beim Menschen vor allem das P450-Isoenzym 3A4 an der N-Demethylierung beteiligt ist, welches dem P450 3A1 der Ratte entspricht.

Bei den Versuchen mit den Substanzen Ciprofibrat, Ciprofibrat-Glycinat, Ciprofibrat-Glycinat-Methylester, Clofibrat und Clofibrat-Glycinat-Methylester wurden die Proben mit Ethylmorphin in verschiedenen Konzentrationen (0, 0,1875, 0,375, 0,75, 1,5, 3 und 6 mM) sowie mit jeweils 4 Konzentrationen der zu testenden Substanz (1, 10, 100 und 1000  $\mu$ M) angefertigt. Bei den übrigen Fibraten wurde nur mit einer Ethylmorphin-Konzentration (6 mM) gearbeitet. Weiterhin wurden zwei Kontrollen (mit und ohne Methanol) und ein Leerwert angefertigt. Die zu testenden Substanzen wurden in Methanol gelöst. Anschließend wurde das Lösungsmittel bei 90°C im Wasserbad verdampft und durch 0,1 ml 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4, ersetzt.

In jedes Reagenzglas wurden

0,5 ml 0,5 M Na-P-Puffer, pH 7,4,

0,05 ml 6 mM NADP, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,  
 0,05 ml 0,1 M G-6-P, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,  
 0,05 ml 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, gelöst in a.d.,  
 0,05 ml 0,2 M Semicarbazid, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,  
 sowie 0,1 ml Ethylmorphin (in den beschriebenen Konzentrationen, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4) gegeben.

Die Leerwerte enthielten anstelle des Ethylmorphins 0,1 ml 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4.

Bei der Eichkurve wurde anstelle des Ethylmorphins Formaldehyd (FA) in verschiedenen Konzentrationen (0, 0,25, 0,5, 1 und 2 µM) verwendet. Die Reaktion wurde mit 0,2 ml 1:4 verdünntem 9000g-Überstand gestartet und nach 10 Minuten durch 0,1 ml 75%ige TCA gestoppt. Die Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 37°C. Den Leerwerten und der Eichkurve wurde die TCA bereits vor der Zugabe des Überstandes zugesetzt, um eine Enzymreaktion zu vermeiden. Sie wurden auch nicht mit inkubiert. Alle Proben wurden dann 15 Minuten bei 5000g zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland). 0,5 ml des entstandenen klaren Überstandes wurden mit 0,5 ml Nash-Reagenz (30 g Ammoniumacetat + 0,4 ml Acetylaceton + 0,6 ml Eisessig ad 100 ml a.d.) bei 37°C 40 Minuten inkubiert. Die Extinktion wurde anschließend mit einem Spektralphotometer (Spekol 11, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 412 nm gegen a.d. gemessen. Sie ist ein Maß für das entstandene Formaldehyd.

Die Enzymaktivität wurde folgendermaßen berechnet:

$$A_{FA} = \frac{\Delta E * F_{EK}}{\text{Prot.} * t}$$

$A_{FA}$  = Enzymaktivität [nmol/(mg Prot.\*min)]

$\Delta E$  = Extinktion der Proben minus Extinktion der Leerwerte

$F_{EK}$  = Faktor der Eichkurve

Prot. = Proteingehalt des 9000g-Überstandes [mg/ml]

t = Inkubationszeit (10 min)

#### 5.4.6. $\omega$ -Laurinsäure-Hydroxylierung (LAOH)

Die Messung der  $\omega$ -Laurinsäure-Hydroxylase-Aktivität erfolgte mit Hilfe der HPLC und fluorimetrischer Detektion, modifiziert nach der Methode von Dirven et al. (1991). Sie charakterisiert das Isoenzym 4A1 des P450. Mit Hilfe des P450 4A1 wird die Laurinsäure zu 11- und 12- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure hydroxyliert. Diese beiden Reaktionsprodukte werden durch die HPLC aufgetrennt. Um die fluorimetrische Messung durchführen zu können, werden sowohl das Substrat als auch die Reaktionsprodukte mit fluoreszierendem 9-Anthryldiazomethan derivatisiert. Als Referenzsubstanz dient 10-Hydroxydecanoin-Säure. Mit den Fibrat-Derivaten wurden Verdünnungsreihen (1, 10, 100 und 1000  $\mu$ M) mit Methanol hergestellt. Das Methanol wurde verdampft. In den Inkubationsansatz kamen zusätzlich:

- 0,125 ml 1 mM Laurinsäure, gelöst in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5,
- 0,250 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5,
- 0,050 ml 0,2 M 10-Hydroxydecanoin-Säure, gelöst in Tris-HCl-Puffer, pH 7,5,
- 0,500 ml unverdünnter 9000g-Überstand,
- 0,025 ml 40 mM NADPH, gelöst in Tris-HCl-Puffer, pH 7,5.

Nach Inkubation des Ansatzes für 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C wurde die Reaktion mit 50  $\mu$ l 3 M HCl gestoppt. Anschließend wurden 2 ml Ethylacetat zugegeben, die Proben geschüttelt und bei 5000g zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland). 1,5 ml des Ethylacetat-Überstandes wurden abpipettiert und anschließend mit 0,2 ml Ethylacetat und 3 ml a.d. versetzt. Daraufhin wurden die Proben erneut geschüttelt, um die restliche HCl zu entfernen. Nach kurzem Zentrifugieren bei 5000g wurde 1 ml der Ethylacetat-Phase abpipettiert und unter strömendem N<sub>2</sub> verdampft. Der Rückstand wurde mit 100  $\mu$ l 13,5 mM 9-Anthryldiazomethan versetzt, erneut geschüttelt und anschließend für die Messung mit Hilfe der HPLC in 100  $\mu$ l-HPLC-Reaktionsgefäß-Einsätze pipettiert.

Die Auftrennung der Derivatisierungsprodukte der 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure und der 12- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure sowie der derivatisierten Laurinsäure selbst erfolgte rechnergestützt mit Hilfe der HPLC. Die Geräte sowie die Software stammten von der Firma Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt, Deutschland. Es wurde eine Nucleosil C18, 4,6\*250 mm-Säule mit einer Partikelgröße von 5  $\mu$ m verwendet. Auf die HPLC-Säule wurden je 20  $\mu$ l der Proben aufgetragen. Die Flußrate betrug 1ml/min bei 30°C. Der Gradient über der Säule ergab sich aus dem Verhältnis der mobilen Phase A (a.d.) und der mobilen Phase B (100% Acetonitril). Die Messung wurde mit 30% der mobilen Phase A und 70% der mobilen Phase B gestartet. Von der 5. bis zur 10. Minute lag der Anteil der mobilen Phase A bei 20%, der der mobilen Phase B bei 80%. Von der 20. bis zur 25. Minute wurde nur noch mit der mobilen

Phase B gespült. Von der 25. Minute bis zur 30. Minute, betrug der Anteil der mobilen Phase A wieder 30% und der der mobilen Phase B 70%. Die fluorimetrische Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Meßwellenlänge von 412 nm.

Bei den Messungen wurden zwei Leerwerte mitgeführt. Leerwert 1 enthielt anstelle des Inkubationsansatzes 0,5 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, und wurde wie alle anderen Hauptwerte weiterbehandelt. Leerwert 2 enthielt 400 µl Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, 50 µl 9000g-Überstand und 50 µl 400 µM 10-Hydroxydecanoin-Säure. Auch dieser Leerwert wurde wie alle Hauptwerte weiterbehandelt.

Die Eichwerte enthielten anstelle der Laurinsäure 0,125 ml 12- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure in verschiedenen Konzentrationen (0, 100, 200, 400 nM). Die Verdünnung der Eichsubstanz erfolgte mit Tris-HCl-Puffer, pH 7,5.

Bei der Auswertung wurden die Integrale der Flächen der Peaks der 11- und der 12- Hydroxy-Laurinsäure sowie die der Referenzsubstanz 10-Hydroxydecanoin-Säure mit Hilfe des Rechners (Programm BORWIN V3, Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt, Deutschland) ausgewertet. Man erhält so die Aktivität der Laurinsäure-Hydroxylase welche in pmol/(mg Prot\*min) angegeben wird.

$$A_{LA} = \frac{FL_{11/12 \text{ OH-Laurins.}} \cdot F_{EK}}{FL_{Ref.} \cdot \text{Prot.} \cdot t}$$

$A_{LA}$  = Enzymaktivität [pmol/(mg Protein\*min)]

$FL_{11/12 \text{ OH-Laurins.}}$  = um entsprechenden Leerwert bereinigte Fläche des Peaks der 11- bzw. der 12- Hydroxy-Laurinsäure

$FL_{Ref.}$  = um entsprechenden Leerwert bereinigte Fläche des Peaks der Referenzsubstanz (10-Hydroxydecanoin-Säure)

$F_{EK}$  = Faktor der Eichkurve

Prot. = Proteingehalt des 9000g-Überstandes [mg/ml]

t = Inkubationszeit (10 min)

## 5.5. Oxidase-Modellreaktionen

### 5.5.1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in Lebermikrosomen

Mit Hilfe von NADPH und O<sub>2</sub> wird unter Mitwirkung des P450 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gebildet. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist ein Zwischenprodukt der schrittweisen Oxidation molekularen Sauerstoffs durch die Oxidasen des P450. Es reagiert mit Ferroammoniumsulfat und Kaliumthiocyanat zu Fe(SCN)<sub>3</sub>, einem roten Farbstoff der kolorimetrisch gemessen werden kann (Hildebrandt et al. 1978).



Die Intensität der Färbung ist ein Maß für die Oxidase-Aktivität des P450.

Die zu testenden Fibrate wurden in Methanol gelöst und auf folgende Endkonzentrationen im Ansatz verdünnt: 1, 10, 100 und 1000 µM. Das Methanol wurde anschließend im Wasserbad bei 90°C verdampft. Weiterhin wurden dem Inkubationsansatz folgende Substanzen zugegeben:

- 0,500 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4,
- 0,050 ml 150 mM KCl, gelöst in a.d.,
- 0,050 ml 10 mM MgCl, gelöst in a.d.,
- 0,025 ml a.d.,
- 0,025 ml 0,5 mM Natriumacid, gelöst in a.d.,
- 0,050 ml Mikrosomensuspension (Proteingehalt = 10 mg/ml).

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,05 ml 0,5 mM NADPH gestartet und nach 20 Minuten mit eisgekühlter 3%iger TCA gestoppt. Während der Inkubation wurden die Proben bei einer Temperatur von 30°C geschüttelt. Nach dem Stoppen der Reaktion wurden die Reaktionsgefäße 20 Minuten bei einer Temperatur von 4°C stengelassen und anschließend mit 5000g zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland). Für die Farbreaktion wurden 2,5 ml des entstandenen Überstandes mit 0,5 ml 10 mM Ferroammoniumsulfat und 0,2 ml 2,5 M Kaliumthiocyanat bei 25°C für 10 Minuten inkubiert. Die Intensität der Färbung wurde am Spektralphotometer (Spekol 11, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 480 nm und einer Küvettenschichtdicke von 1 cm gegen Wasser gemessen. Zu jeder Meßreihe wurde eine Eichkurve angefertigt. Dafür wurde eine 30%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stammlösung verwendet, deren Wasserstoffperoxid-Gehalt durch Titration mit 0,1 M Kaliumpermanganat für jede Eichkurve neu ermittelt wurde. Die Titration erfolgte im sauren Milieu, was durch Zugabe von 20%iger Schwefelsäure erreicht wurde. Hierzu wurden 5 ml

Stammlösung mit 2 ml 20%iger Schwefelsäure versetzt und anschließend tropfenweise Kaliumpermanganat zugegeben, bis die Lösung anfing, sich rosa zu färben. Die Eichkurve enthielt alle Substanzen wie die Hauptwerte. Die eisgekühlte TCA wurde jedoch vor Zugabe der Mikrosomen und des Wasserstoffperoxids zugesetzt, um eine Enzymreaktion zu vermeiden. Für jede Mikrosomenprobe wurde ein Leerwert mitgeführt, welcher alle Substanzen der Hauptwerte enthielt. Dieser wurde nicht inkubiert und die TCA wurde vor den Mikrosomen zugegeben. Die Oxidase-Aktivität des P450 wurde nach folgender Formel berechnet:

$$A_{H_2O_2} = \frac{\Delta E \cdot F_{EK}}{\text{Prot.} \cdot t}$$

$A_{H_2O_2}$	= Oxidase-Aktivität [nmol/(mg Prot.*min)]
$\Delta E$	= Extinktionsdifferenz (Extinktion Inkubationsansatz – Extinktion Leerwert)
$F_{EK}$	= Faktor der Eichkurve
Prot.	= Proteingehalt der Mikrosomensuspension [mg/ml]
t	= Inkubationszeit (20 Minuten)

#### 5.5.2. NADPH-/ $Fe^{2+}$ -stimulierte Lipidperoxidation (LPO) in Lebermikrosomen

Aus dem Reaktionszyklus des P450 werden Radikale bzw. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt. Diese führen zur Oxidation von ungesättigten Fettsäuren, die drei oder mehr Doppelbindungen besitzen. Hierbei kommt es zur Bildung von Endoperoxiden. Die entstehenden Endoperoxide sind nicht stabil und zerfallen. Einige der Lipidperoxidationsprodukte sind in der Lage, mit Thiobarbitursäure (TBA) zu reagieren. Sie werden daher als Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) bezeichnet. Mit etwa 60% stellt Malondialdehyd (MDA) den größten Anteil der TBARS dar, was mit Hilfe der HPLC nachgewiesen werden konnte (Esterbauer und Zollner 1989; Tomita et al. 1990). Das MDA reagiert mit TBA bei 100°C zu Trimethin, einem roten Farbstoff. Die Extinktion des Trimethins ist ein indirektes Maß für die während der Inkubationszeit freigesetzten Radikale (Buege und Aust 1978).

Die zu testenden Substanzen wurden wieder in Methanol gelöst und mit Methanol auf folgende Endkonzentrationen im Ansatz verdünnt: 1, 10, 100 und 1000  $\mu$ M. Es wurden je 0,05 ml der verdünnten Fibrat in die entsprechenden Reagenzgläser pipettiert. Der Methanol-

Kontrolle wurde stattdessen 0,05 ml Methanol zugegeben. Die Kontrollwerte und die Leerwerte erhielten 0,05 ml a.d.. Das Lösungsmittel Methanol wurde bei 90°C verdampft.

Des weiteren wurden den Proben folgende Reagenzien zugesetzt:

0,35 ml 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,

0,05 ml 0,5 mM Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung, gelöst in a.d.,

0,05 ml Mikrosomensuspension (Proteingehalt 2,5 mg/ml).

Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 0,05 ml 0,5 mM NADPH (gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4). Die Proben wurden bei 37°C 10 Minuten inkubiert und dabei geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 30%iger TCA gestoppt. Den Leerwerten wurde die TCA bereits vor den Mikrosomen zugegeben, um eine Enzymreaktion zu verhindern. Sie wurden auch nicht mit inkubiert. Allen Proben wurde dann 1 ml 0,67%ige TBA zugefügt, die in 0,6%iger NaOH gelöst war. Die Reagenzgläser wurden verschlossen und für 15 Minuten auf 100°C erhitzt. Danach wurden sie 10 Minuten bei 5000g zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland). Anschließend erfolgte die Messung am Spekol 11 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 536 nm. Die Oxidase-Aktivität wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt:

$$A_{\text{TBARS}} = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d \cdot t \cdot \text{Prot.} \cdot V}$$

$A_{\text{TBARS}}$  = Oxidase-Aktivität [nmol TBARS/(mg Protein\*min)]

$\Delta E$  = Extinktion der Proben minus Extinktion der Leerwerte

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient =  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$d$  = Schichtdicke = 1 cm

$t$  = Inkubationszeit = 10 Minuten

Prot. = Proteingehalt der Mikrosomensuspension = 2,5 mg/ml

$V$  = Meßvolumen = 1,5 ml

### 5.5.3. Luminol- bzw. Lucigenin-verstärkte mikrosomale Chemilumineszenz

Mit der mikrosomalen Chemilumineszenz werden ebenfalls Radikale erfaßt, die im Reaktionszyklus des P450 freigesetzt werden. Bei dieser Methode werden Lichtimpulse registriert, die durch chemische Reaktionen entstehen. Dabei bedient man sich der Substanzen Luminol bzw. Lucigenin, die während der Reaktionen selbst zu Radikalen werden und so die

Chemilumineszenzmessung verstärken. Die beiden Verstärkersubstanzen charakterisieren dabei verschiedene Radikale (Klinger et al. 1996).

Bei der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz reagiert das Lucigenin vor allem mit  $O_2^{\bullet-}$ -Radikalen (Müller-Peddinghaus und Wurl 1987). Klinger et al. zeigten 1996, daß sich mit der Methode auch  $OH^{\bullet}$  und organische Radikale nachweisen lassen.

Die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz dient dem Nachweis von Wasserstoffperoxid (Müller-Peddinghaus und Wurl 1987), aber auch  $O_2^{\bullet-}$  und  $OH^{\bullet}$  lassen sich gut nachweisen (Faulkner und Fridovich 1993). Klinger et al. zeigten 1996 mit Hilfe der antioxidativen Enzyme Katalase und Superoxiddismutase, daß mit der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz v.a. der Nachweis von  $O_2^{\bullet-}$  und  $OH^{\bullet}$  gelingt.

Die Chemilumineszenzmessung wurde an Mikrosomen durchgeführt. Die zu untersuchenden Fibrate wurden in Methanol gelöst und es wurde eine Verdünnungsreihe mit folgenden Endkonzentrationen im Ansatz hergestellt: 1, 10, 100 und 1000  $\mu M$ . Die Zugabe betrug 0,1 ml. Zusätzlich wurden Kontrollen mit und ohne Methanol sowie Leerwerte, die anstelle der Mikrosomen 0,1 ml Na-P-Puffer, pH 7,4, enthielten, angefertigt. Das Methanol wurde im Wasserbad bei 90°C verdampft.

Die Chemilumineszenz-Messung wurde mit einem Autolumat LB 953 (Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Es wurde über einen Zeitraum von 3,5 Minuten gemessen.

Die Testsubstanzen wurden wie oben beschrieben verdünnt und das Lösungsmittel verdampft. Weiterhin wurden folgende Lösungen zugesetzt:

- 1,1 ml 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,
- 0,2 ml 0,5 mM  $Fe_2SO_4$ , gelöst in a.d.,
- 0,2 ml 5 mM Lucigenin, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,
- 0,2 ml Mikrosomensuspension (Proteingehalt 0,1 mg/2 ml).

Durch das Injektionssystem des Gerätes wurde dem Ansatz 0,3 ml 0,1 mM in a.d. gelöstes NADPH zugegeben, um die Reaktion zu starten.

Nach dem Start der Reaktion wurde die Anzahl der Lichtimpulse (Counts) / Zeit (3,5 min) durch das Gerät gemessen. Diese wurden auf 1 Minute umgerechnet (Counts per minute = CPM) und die Aktivität wie folgt ermittelt:

$$A_{LCCL} = \frac{\Delta CPM}{Prot.}$$



$A_{\text{LCCL}}$  = Oxidase-Aktivität [CPM/mg Protein]  
 $\Delta\text{CPM}$  = Differenz der Lichtimpulse pro Minute (Counts per minute) der  
 Proben- und  
 der Leerwerte  
 Prot. = Proteingehalt des Ansatzes [mg/ml]

Die Bestimmung der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz erfolgte analog der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz. Anstelle von 0,2 ml 5 mM Lucigenin wurde 0,2 ml 0,3 mM Luminol, das ebenfalls in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4, gelöst wurde, zugegeben. Die Reaktion wurde wieder durch das automatische Injektionssystem des Autolumat LB 953 mit 0,3 ml 0,1 mM NADPH gestartet. Die gemessenen Impulse wurden wie bei der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz bestimmt, auf eine Minute umgerechnet und die Aktivität entsprechend der oben angegebenen Formel ermittelt.

## 5.6. Luminol-verstärkte Chemilumineszenz im Rattenvollblut

Bei der Messung der Chemilumineszenz im Rattenvollblut werden Radikale registriert, die bei der Phagozytose durch Leukozyten entstehen. Das Radikal-produzierende Enzym ist hier die NADPH-Oxidase.

Die Leukozyten des Rattenblutes wurden durch Serum-opsoniertes Zymosan zur Phagozytose angeregt. Bei der Phagozytose entstehen Radikale, welche in den Körper eingedrungene Mikroorganismen schädigen sollen. Die Radikale erzeugen Photonenemissionen, die durch Luminol verstärkt werden und meßbar sind (Allen 1986).

Mit den in Methanol gelösten Substanzen wurde eine Verdünnungsreihe mit folgenden Endkonzentrationen im Ansatz angefertigt: 1, 10, 100 und 1000  $\mu\text{M}$ . 0,1 ml der verdünnten Substanz wurde in die entsprechenden Reagenzgläser pipettiert. Eine Kontrolle mit und ohne Methanol sowie Leerwerte wurden mitgeführt. Die Verdampfung des Lösungsmittels Methanol erfolgte im Wasserbad bei 90°C.

Für den Versuch wurden ein Glukose- und Albumin-enthaltender Phosphatpuffer (PBSGA-Puffer) und ein Meßpuffer mit folgender Zusammensetzung verwendet:

PBSGA-Puffer, pH 7,4:

4 g NaCl  
0,1 g KCl  
0,362 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,57 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,5 g D-Glukose  
0,5 g Rinderserumalbumin  
auf 400 ml mit a.d. aufgefüllt

Meßpuffer, pH 7,4:

3,8 g NaCl  
0,165 g KCl  
0,5 g Eagle-Medium ohne Phenolrot  
2,5 ml 0,1 M MgCl  
0,5 g D-Glukose  
0,5 g Rinderserumalbumin  
auf 400 ml mit a.d. aufgefüllt

Das Vollblut wurde nach der Dekapitation der narkotisierten Ratten in heparinisierten Reagenzgläsern aufgefangen. Einem ml Blut wurden 5000 I.E. Heparin (B. Braun, Melsungen, Deutschland) zugesetzt. Anschließend wurde das heparinisierte Blut mit dem PBSGA-Puffer verdünnt, wobei 0,2 ml Blut mit 2,3 ml Puffer gemischt wurden, um im Ansatz von 2 ml eine Verdünnung von 1:500 zu erreichen.

Den Proben wurden folgende Substanzen zugesetzt:

1,75 ml Meßpuffer,  
0,10 ml 150 µM Luminol,  
0,05 ml verdünntes Blut,  
0,10 ml opsoniertes Zymosan (300 µg/0,1 ml).

Die Photoemissionen wurden dann über 90 Minuten bei 37°C mit dem Autolumat LB 593 erfaßt. Angegeben werden „relative light units“ (RLU) / 90 Minuten / 10<sup>6</sup> Leukozyten.

## 5.7. Herkunft der verwendeten Substanzen und Lösungen

Eisen (II)-sulfat-Heptahydrat, Ethylmorphinhydrochlorid, Formaldehyd, 4-Nitrobrenzkatechin, p-Nitrophenol, 2-Thiobarbitursäure, 30%iges Wasserstoffperoxid: *Merck, Darmstadt, Deutschland*;

Luminol, Lucigenin, Zymosan: *Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Deutschland*;

Anilin, Bezafibrat, Clofibrat, Eagle-Medium ohne Phenolrot, 7-Ethoxycoumarin, 7-Ethoxyresorufin, Fenofibrat, Gemfibrozil, D-Glukose, Glukose-6-Phosphat, Hexobarbital, 7-Hydroxycoumarin, 10-Hydroxydecanoinsäure, ω-12-Hydroxy-Laurinsäure, Laurinsäure, 7-Pentoxycoumarin, Resorufin, Rinderserumalbumin, Semicarbazid: *Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA*.

Ciprofibrat wurde freundlicherweise von *Sterling-Winthrop Research Centre, Alnwick, Northumberland, U.K.*, zur Verfügung gestellt.

Die Glycinat- und Glycinat-Methylester-Verbindungen von Ciprofibrat, Clofibrat, Bezafibrat, Fenofibrat und Gemfibrozil wurden im Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Prof. Dr. Dres. h.c. H. Oelschläger) synthetisiert.

Alle anderen hier nicht speziell aufgeführten Chemikalien und Lösungen besaßen sämtlich den höchsten Reinheitsgrad und wurden von der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland, bezogen.

### **5.8. Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse**

Mit Ausnahme der Ermittlung des spektralen Bindungsverhaltens wurden alle Versuche mit 9000g-Überstand bzw. Mikrosomen von 6 verschiedenen Tieren (n=6) durchgeführt. Zur Ermittlung des spektralen Bindungsverhaltens wurden Mikrosomen von je 3 Tieren (n=3) verwendet. Die graphischen Darstellungen zeigen die arithmetischen Mittelwerte und den Standardfehler (S.E.M.).

Die Signifikanzberechnungen wurden mit dem gepaarten t-Test nach Student durchgeführt, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $\leq 5\%$  als signifikant betrachtet wurde. Signifikanzen wurden in den Graphiken mit einem Stern gekennzeichnet.

## 6. VERSUCHSERGEBNISSE

Eine tabellarische Zusammenfassung aller Versuchsergebnisse findet sich in Abschnitt 6.5. ab Seite 64. Im Anhang ab Seite 94 sind für jede Substanz die jeweiligen Effekte auf die untersuchten Modellreaktionen nochmals einzeln graphisch gezeigt. In den Abbildungen des Ergebnisteils sind nur die Befunde vergleichend dargestellt worden, die bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ , einer physiologisch maximal zu erwartenden Konzentration, gemessen worden sind. Signifikante Unterschiede wurden jeweils zu den zugehörigen Kontrollen (= 100%) ermittelt (gepaarter t-Test nach Student; Irrtumswahrscheinlichkeit  $\leq 5\%$ ) und sind mit einem Stern gekennzeichnet.

### 6.1. Spektrales Bindungsverhalten der untersuchten Substanzen an das Cytochrom P450

Ciprofibrat-Glycinat, Ciprofibrat-Glycinat-Methylester, Clofibrat-Glycinat-Methylester, Gemfibrozil, Gemfibrozil-Glycinat sowie Gemfibrozil-Glycinat-Methylester zeigten ein Bindungsverhalten vom Typ I (Hexobarbital-Typ). Auch das Bindungsverhalten von Clofibrat-Glycinat entsprach dem Hexobarbitaltyp, war jedoch nicht so charakteristisch wie bei den anderen Substanzen. Clofibrat, Bezafibrat, Bezafibrat-Glycinat, Bezafibrat-Glycinat-Methylester, Fenofibrat-Glycinat und Fenofibrat-Glycinat-Methylester wiesen ein spektrales Bindungsverhalten vom Typ II (Anilin-Typ) auf. Ciprofibrat und Fenofibrat verhielten sich ebenfalls ähnlich dem Anilin, jedoch war die spektrale Bindung bei diesen Substanzen deutlich schwächer ausgeprägt.

### 6.2. Einfluß der untersuchten Substanzen auf die Monooxygenasefunktion des Cytochrom P450

#### 6.2.1. Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD)

**Ciprofibrat** hemmte die EROD erst ab einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  signifikant. Die Reduktion der Enzymaktivität betrug dabei 80%. Die Effekte des Ciprofibrat-Glycinats waren deutlich ausgeprägter als die der „Muttersubstanz“. Der Substratumsatz sank bereits bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  um 50%. Bei 1000  $\mu\text{M}$  betrug die Hemmwirkung 85%. Die Verminderung der Enzymaktivität durch Ciprofibrat-Glycinat-Methylester war mit der des Ciprofibrat-Glycinats fast identisch (bei 100 und 1000  $\mu\text{M}$  Hemmung um 50% bzw. 90%).

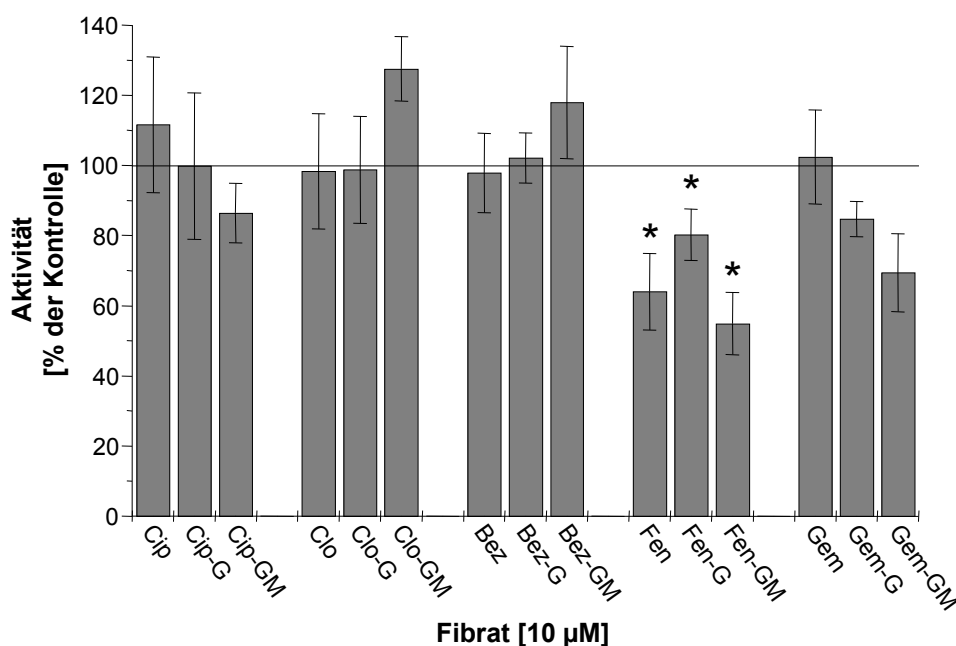
**Clofibrat** hatte keinen Einfluß auf diese Modellreaktion. Auch Clofibrat-Glycinat und Clofibrat-Glycinat-Methylester verminderten die EROD-Aktivität lediglich bei der maximalen Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  um ca. 65%.

**Bezafibrat** führte ebenfalls nur bei der maximalen Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Reduktion des Substratumsatzes um 60%. Bei Bezafibrat-Glycinat trat bereits bei 100  $\mu\text{M}$  eine geringe, jedoch signifikante Verringerung der Enzymaktivität um 5% auf. Bei 1000  $\mu\text{M}$  Bezafibrat-Glycinat betrug die Hemmwirkung 30%. Der Einfluß der Glycinat-Methylester-Verbindung auf die EROD war stärker als der der „Muttersubstanz“ und deren Glycinat. 100  $\mu\text{M}$  Bezafibrat-Glycinat-Methylester führten zu einer Verminderung des Substratumsatzes um ca. 65%, 1000  $\mu\text{M}$  zu einer Hemmung um 85%.

Die beiden Derivate des **Fenofibrats** reduzierten die EROD ähnlich wie Fenofibrat selber. Eine signifikante Hemmwirkung trat bei allen drei Substanzen ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf. Bei dieser Konzentration kam es zu einer Reduktion des Substratumsatzes um 35% bei Fenofibrat, um 20% bei Fenofibrat-Glycinat und um 45% bei Fenofibrat-Glycinat-Methylester. Bei einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  ließ sich eine Zunahme des Ausmaßes der Hemmwirkung vom Fenofibrat (um 40%) über das Glycinat (um 70%) zur Glycinat-Methylester-Verbindung (um 80%) feststellen.

**Gemfibrozil** verminderte den Substratumsatz bei 100 und 1000  $\mu\text{M}$  um 50% bzw. 75%. Beim Gemfibrozil-Glycinat war die Hemmwirkung deutlich schwächer ausgeprägt. Nur bei der höchsten Substanzkonzentration (1000  $\mu\text{M}$ ) kam es zu einer signifikanten Verminderung der Enzymaktivität um 60%. Der Einfluß von Gemfibrozil-Glycinat-Methylester war dagegen stärker als der von Gemfibrozil und dessen Glycinat. Bei 100  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil-Glycinat-Methylester wurde der Substratumsatz bereits um ca. 80% reduziert, bei 1000  $\mu\text{M}$  betrug die Hemmwirkung 90%.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß keine der untersuchten Substanzen diese Modellreaktion hemmte wenn sie in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  vorlag. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  waren drei der untersuchten Fibrate (Fenofibrat, Fenofibrat-Glycinat und Fenofibrat-Glycinat-Methylester) in der Lage, die EROD-Aktivität signifikant zu verringern. Keinen Einfluß auf den Substratumsatz hatte Clofibrat.



**Abbildung 2:** Einfluß der untersuchten Fibrate in einer Konzentration von 10 µM auf die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung im 9000g-Überstand von Rattenlebern in vitro. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte ± S.E.M.; n = 6; \*:  $p \leq 0,05$  versus jeweilige zugehörige Kontrolle (= 100%). Cip: Ciprofibrat; Clo: Clofibrat; Bez: Bezafibrat; Fen: Fenofibrat; Gem: Gemfibrozil; G: Glycinat; GM: Glycinat-Methylester.

#### 6.2.2. Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD)

**Ciprofibrat** hemmte diese Modellreaktion signifikant ab einer Konzentration von 100 µM. Der Effekt war nicht sehr stark ausgeprägt (Reduktion um 15%). Die höchste Konzentration der Substanz (1000 µM) verringerte den Substratumsatz um ca. 30%. Das Glycinat des Ciprofibrats verhielt sich ähnlich der „Muttersubstanz“. Die ECOD wurde ebenfalls ab 100 µM signifikant gehemmt. 1000 µM Ciprofibrat-Glycinat führten zu einer Reduktion des Substratumsatzes um 35%. Ciprofibrat-Glycinat-Methylester verminderte die ECOD-Aktivität deutlich stärker als die „Muttersubstanz“ Ciprofibrat und deren Glycinat. Bereits ab einer Konzentration von 1 µM kam es zu einer signifikanten Reduktion des Substratumsatzes um ca. 10%. Bei der höchsten Konzentration (1000 µM) fand sich eine Hemmung um 90%.

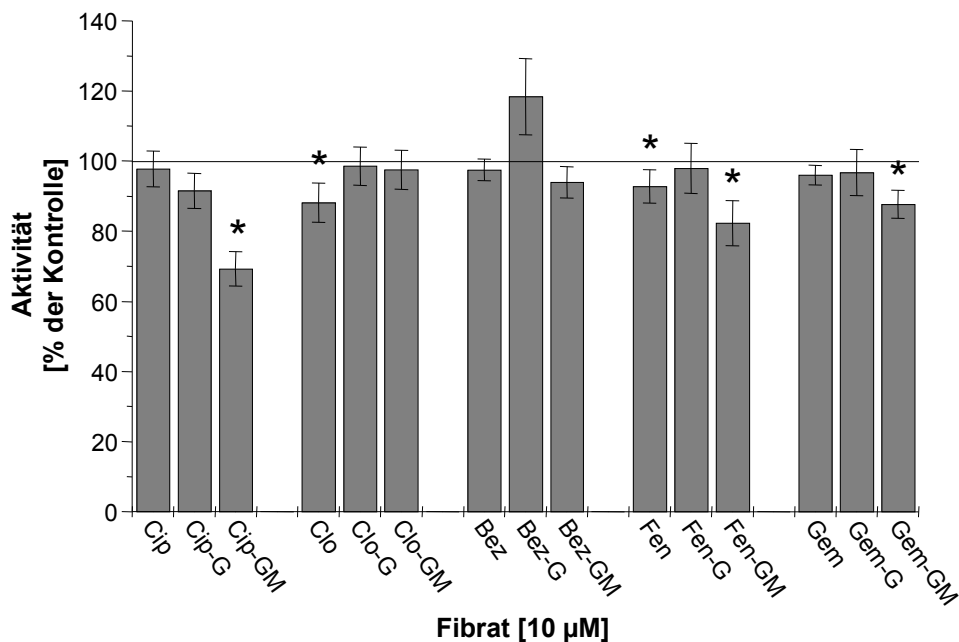
**Clofibrat** hatte einen nur geringen Einfluß auf die ECOD. Nur bei 10 und 100 µM kam es zu einer geringen Verminderung des Substratumsatzes um 15 bzw. 20%. Clofibrat-Glycinat bewirkte eine Reduktion der Enzymaktivität um 15% bei einer Konzentration von 100 µM, bei 1000 µM waren es 30%. Clofibrat-Glycinat-Methylester verhielt sich ähnlich dem Clofibrat-Glycinat. Die Hemmung war nur schwach ausgeprägt (ca. 35%) und erst bei der höchsten Konzentration (1000 µM) signifikant.

**Bezafibrat** reduzierte den Substratumsatz nur, wenn es in der höchsten Konzentration (1000  $\mu\text{M}$ ) vorlag. Die Enzymaktivität wurde dann um 25% vermindert. Etwas deutlicher waren die Ergebnisse mit Bezafibrat-Glycinat. Ab einer Substanz-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  kam es zu einer signifikanten Reduktion des Substratumsatzes um 15%. Lag die Substanz in einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  vor, betrug die Verringerung 60%. Der Einfluß von Bezafibrat-Glycinat-Methylester auf die ECOD war ebenfalls nicht sehr stark, jedoch insgesamt am ausgeprägtesten. Der Substratumsatz verringerte sich bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  um 45%. Bei der maximalen Konzentration (1000  $\mu\text{M}$ ) waren es 80%.

**Fenofibrat** reduzierte die ECOD bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  signifikant. Der Effekt war jedoch nicht sehr deutlich. Bei 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  war eine Hemmung um ca. 10% zu beobachten. Auch bei der höchsten Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  wurde die Enzymaktivität nur um ca. 20% verringert. Ähnliche Ergebnisse erbrachten die Untersuchungen mit Fenofibrat-Glycinat. Die Substanz hemmte die ECOD jedoch erst ab einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  signifikant. Auch hier war der Effekt nur gering (ca. 30%). Fenofibrat-Glycinat-Methylester verminderte die ECOD deutlich stärker als Fenofibrat und dessen Glycinat-Verbindung. So kam es bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Verringerung der Enzymaktivität um 10%. Bei der maximalen Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  betrug die Hemmwirkung 65%.

**Gemfibrozil** beeinflusste wiederum diese Modellreaktion nur wenig. 100 und 1000  $\mu\text{M}$  der Substanz führten zu einer Reduktion der Enzymaktivität um 10% bzw. 25%. Ähnliche Ergebnisse erbrachten die Untersuchungen mit Gemfibrozil-Glycinat. Die Glycinat-Methylester-Verbindung hemmte die ECOD stärker als die „Muttersubstanz“ und das Glycinat. Ein Effekt war bereits bei 10  $\mu\text{M}$  zu beobachten (Hemmung um 10%). Bei Substanzkonzentrationen von 100 und 1000  $\mu\text{M}$  verringerte sich der Substratumsatz um 45% bzw. 75%.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der Einfluß der untersuchten Substanzen auf diese Modellreaktion nur gering war. Nur fünf Substanzen (Ciprofibrat-Glycinat-Methylester, Clofibrat, Fenofibrat, Fenofibrat-Glycinat-Methylester und Gemfibrozil-Glycinat-Methylester) führten zu einer signifikanten Hemmung der ECOD, wenn sie in einer Konzentration von  $\leq 10$   $\mu\text{M}$  vorlagen. Beim Ciprofibrat-Glycinat-Methylester und beim Fenofibrat-Glycinat-Methylester war der Effekt auf die Modellreaktion am ausgeprägtesten.



**Abbildung 3:** Einfluß der untersuchten Fibrate in einer Konzentration von 10 µM auf die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung im 9000g-Überstand von Rattenlebern in vitro. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.; n = 6; \*:  $p \leq 0,05$  versus jeweilige zugehörige Kontrolle (= 100%). Cip: Ciprofibrat; Clo: Clofibrat; Bez: Bezafibrat; Fen: Fenofibrat; Gem: Gemfibrozil; G: Glycinat; GM: Glycinat-Methylester.

### 6.2.3. Pentoxyresorufin-O-Depentylierung (PROD)

**Ciprofibrat** hatte kaum Einfluß auf die PROD. Lediglich bei der höchsten Konzentration (1000 µM) kam es zu einer Verminderung des Substratumsatzes um 55%. Beim Ciprofibrat-Glycinat trat bereits bei 10 µM ein geringer, jedoch signifikanter Effekt auf. Zu einer relevanten Reduktion der PROD kam es allerdings erst bei einer Konzentration von 1000 µM (um 50%). Ciprofibrat-Glycinat-Methylester hemmte diese Modellreaktion deutlich stärker als Ciprofibrat oder Ciprofibrat-Glycinat. Bei einer Konzentration des Ciprofibrat-Glycinat-Methylesters von 100 µM sank der Substratumsatz um 50%, bei 1000 µM um über 90%.

**Clofibrat** hatte keine Wirkung auf die PROD. Beim Clofibrat-Glycinat kam es zu einer geringen Hemmung der PROD um 15% bei der höchsten Konzentration (1000 µM). Der Einfluß der Glycinat-Methylester-Verbindung des Clofibrats war wiederum stärker. Bei einer Konzentration von 1000 µM verminderte Clofibrat-Glycinat-Methylester den Substratumsatz um 80%. Bei niedrigeren Konzentrationen hatte die Substanz jedoch ebenfalls keine Wirkung.

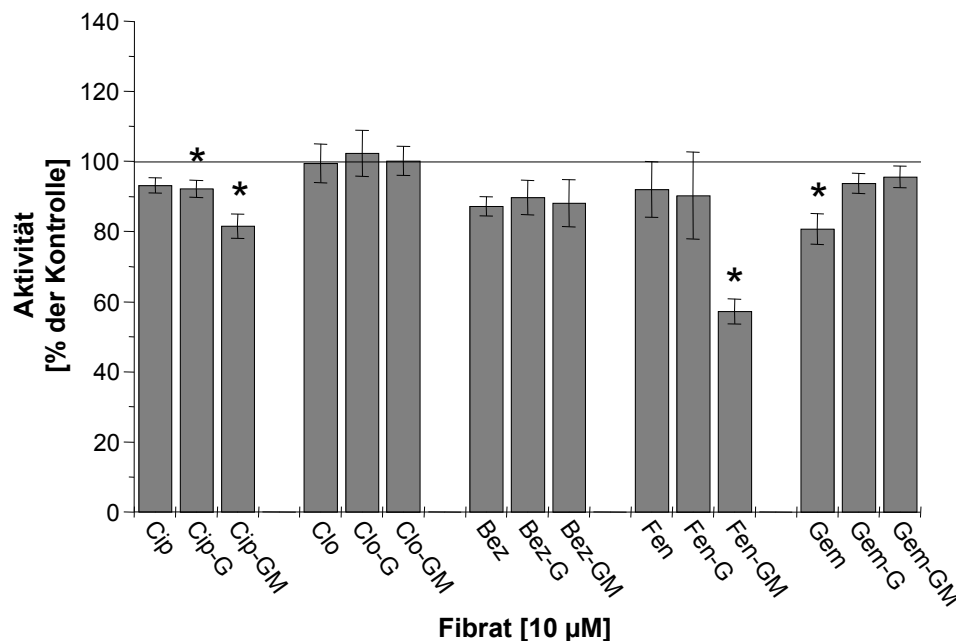
Auch **Bezafibrat** und Bezafibrat-Glycinat beeinflussten die PROD nicht. Bezafibrat-Glycinat-Methylester verminderte dagegen den Substratumsatz bei einer Konzentration von 100 µM um 55% und bei 1000 µM um 80%.



Ebenfalls keinen Einfluß auf die PROD hatte **Fenofibrat**. Bei Fenofibrat-Glycinat war nur bei der höchsten Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  eine Hemmung um ca. 60% zu beobachten. Fenofibrat-Glycinat-Methylester, hingegen, verminderte die Enzymaktivität bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  deutlich um ca. 50%. Höhere Konzentrationen führten zu einer zunehmenden Reduktion des Substratumsatzes um bis zu 80%.

**Gemfibrozil** verminderte die PROD bereits bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  um 20%, bei 1000  $\mu\text{M}$  waren es 80%. Bei Gemfibrozil-Glycinat wurde erst bei der höchsten Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  eine signifikante Reduktion des Substratumsatzes um ca. 65% beobachtet. Es wies damit deutliche Unterschiede zur „Muttersubstanz“ auf. Bei Gemfibrozil-Glycinat-Methylester war dagegen die Hemmung schon ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  signifikant und stark ausgeprägt (um 65%). Bei 1000  $\mu\text{M}$  betrug die Verminderung der Enzymaktivität dann über 90%.

Insgesamt war die Wirkung der untersuchten Substanzen auf die PROD nur gering. Clofibrat, Bezafibrat, Bezafibrat-Glycinat und Fenofibrat hatten keinen Einfluß auf die Modellreaktion. Einzig Fenofibrat-Glycinat-Methylester bewirkte bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  einen signifikanten Effekt. Die übrigen Fibrat-Derivate erzielten jedoch nur mäßige Hemmwirkungen.



**Abbildung 4:** Einfluß der untersuchten Fibrate in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf die Pentoxyresorufin-O-Depentylierung im 9000g-Überstand von Rattenlebern in vitro. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.; n = 6; \*:  $p \leq 0,05$  versus jeweilige zugehörige Kontrolle (= 100%). Cip: Ciprofibrat; Clo: Clofibrat; Bez: Bezafibrat; Fen: Fenofibrat; Gem: Gemfibrozil; G: Glycinat; GM: Glycinat-Methylester.

#### 6.2.4. p-Nitrophenol-Hydroxylierung (p-NPH)

**Ciprofibrat** hemmte diese Modellreaktion nicht. Die Glycinat-Verbindung führte ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zu einer geringen Verminderung der Aktivität um ca. 10%. Auch bei einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  betrug die Hemmwirkung nur 20%. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich mit Ciprofibrat-Glycinat-Methylester.

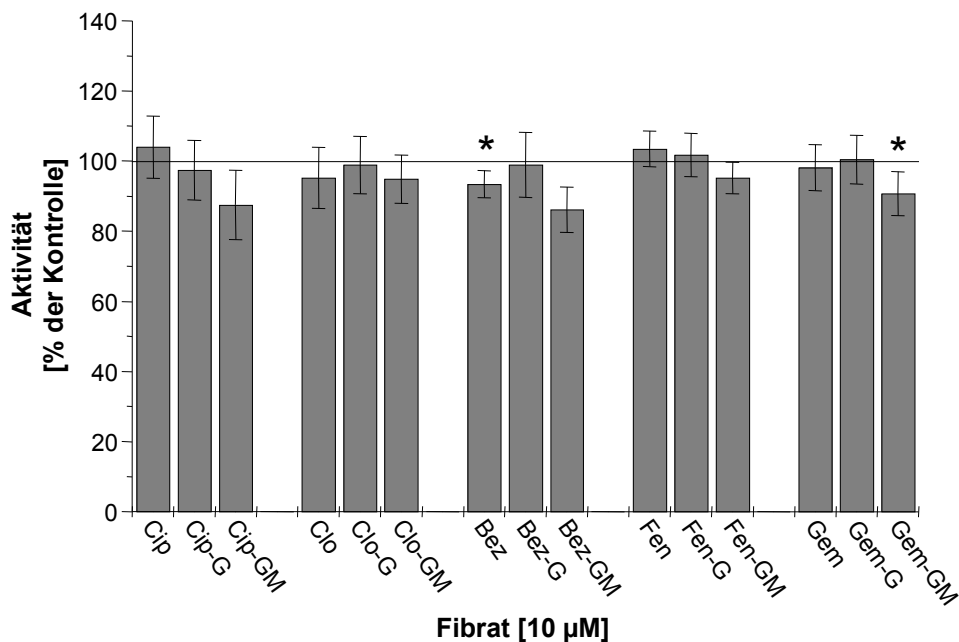
Auch **Clofibrat** hatte nur einen geringen Einfluß auf die p-NPH. Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  wurde die Enzymaktivität um 10% verringert. Eine Konzentration des Fibrates von 1000  $\mu\text{M}$  reduzierte den Substratumsatz um 35%. Clofibrat-Glycinat und Clofibrat-Glycinat-Methylester hatten keine Wirkung auf diese Modellreaktion.

**Bezafibrat** hemmte die p-NPH bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  signifikant. Insgesamt war dieser Effekt jedoch nicht sehr ausgeprägt. So wurde die Aktivität auch bei der höchsten Fibrat-Konzentration (1000  $\mu\text{M}$ ) nur um ca. 25% reduziert. Noch geringer war der Einfluß von Bezafibrat-Glycinat oder Bezafibrat-Glycinat-Methylester. Lediglich bei einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  kam es zu einer signifikanten Verminderung des Substratumsatzes um ca. 20%.

**Fenofibrat** hatte keinen Einfluß auf die p-NPH. Beim Fenofibrat-Glycinat kam es bei einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  zu einer geringen Erhöhung des Substratumsatzes um ca. 10%. Auch der Einfluß von Fenofibrat-Glycinat-Methylester war nicht sehr ausgeprägt. Nur bei einer Konzentration der Substanz von 1000  $\mu\text{M}$  fand sich eine Verringerung der Enzymaktivität um ca. 20%.

Auch **Gemfibrozil** und seine Glycinat-Verbindung zeigten keine Wirkung auf die p-NPH. Gemfibrozil-Glycinat-Methylester hemmte die Modellreaktion ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  signifikant. Diese Reduktion war jedoch ebenfalls nur gering ausgeprägt. Bei einer Konzentration der Substanz von 1000  $\mu\text{M}$  war eine Verminderung der p-NPH lediglich um 20% zu verzeichnen.

Es läßt sich zusammenfassen, daß, falls eine Hemmung der p-NPH durch die untersuchten Substanzen auftrat, diese nur gering war. Keines der Fibrate verminderte die Enzymaktivität signifikant bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ . Bezafibrat und Gemfibrozil-Glycinat-Methylester beeinflussten diese Modellreaktion ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Das Ausmaß der Hemmwirkung durch diese drei Substanzen war jedoch nicht sehr stark ausgeprägt.



**Abbildung 5:** Einfluß der untersuchten Fibrate in einer Konzentration von 10 µM auf die p-Nitrophenol-Hydroxylierung im 9000g-Überstand von Rattenlebern in vitro. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.; n = 6; \*:  $p \leq 0,05$  versus jeweilige zugehörige Kontrolle (= 100%). Cip: Ciprofibrat; Clo: Clofibrat; Bez: Bezafibrat; Fen: Fenofibrat; Gem: Gemfibrozil; G: Glycinat; GM: Glycinat-Methylester.

#### 6.2.5. Ethylmorphin-N-Demethylierung (ENDM)

**Ciprofibrat** hemmte die ENDM erst ab einer Konzentration von 1000 µM und lediglich um 30%. Auch bei Ciprofibrat-Glycinat war der Effekt nicht sehr ausgeprägt. Der Substratumsatz war zwar bereits bei einer Ciprofibrat-Glycinat-Konzentration von 100 µM signifikant verringert, bei der maximalen Konzentration des Fibrates wurde die ENDM jedoch ebenfalls nur um 30% reduziert. Ciprofibrat-Glycinat-Methylester verursachte eine signifikante Verminderung der ENDM bereits bei einer Konzentration von 10 µM. Das Ausmaß der Hemmwirkung war insgesamt jedoch auch nicht stärker ausgeprägt als bei der „Muttersubstanz“ und dem Glycinat (maximal 30%).

Auch **Clofibrat** hatte fast keinen Einfluß auf die ENDM. Eine signifikante Hemmung um 10% trat erst ab einer Konzentration von 1000 µM auf. Dagegen bewirkte Clofibrat-Glycinat bereits bei einer Konzentration von 1 µM eine signifikante Hemmung der Modellreaktion. Der Effekt war jedoch äußerst gering und betrug lediglich ca. 5% bei Konzentrationen von 1, 10 und 100 µM und 15% bei einer Konzentration von 1000 µM. Die Ergebnisse mit Clofibrat-Glycinat-Methylester waren fast identisch mit denen der „Muttersubstanz“.

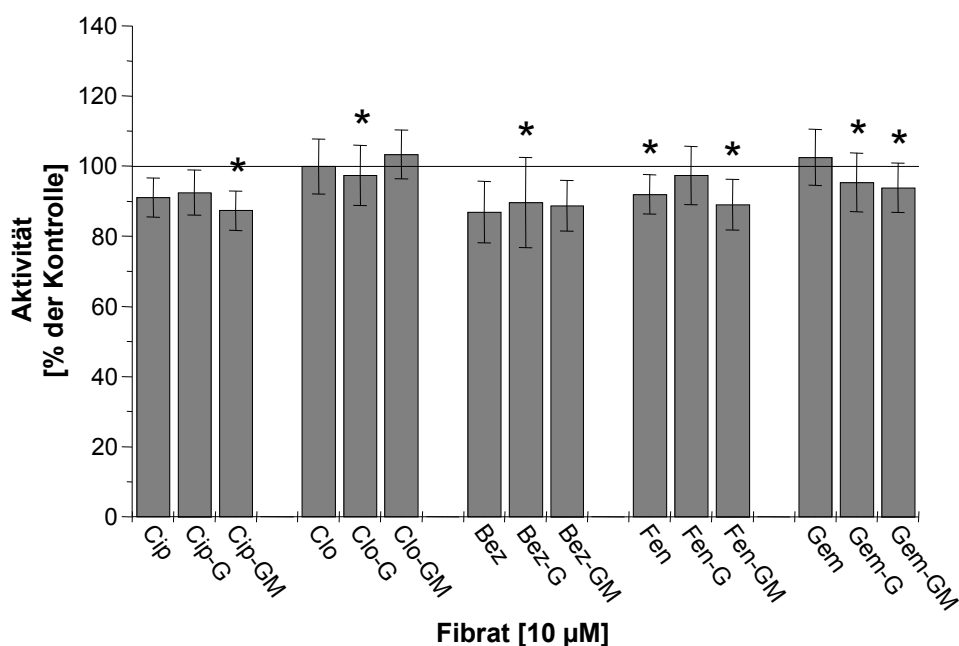
Ebenso beeinflusste **Bezafibrat** diese Modellreaktion nur wenig. Ab einer Konzentration von 100 µM trat ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle auf. Bei 1000 µM betrug

die Hemmwirkung ca. 30%. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Versuche mit Bezafibrat-Glycinat. Eine geringe, aber signifikante Hemmung war bei Konzentrationen von 10 und 100  $\mu\text{M}$  zu verzeichnen. Bei 1000  $\mu\text{M}$  war jedoch auch hier lediglich eine Reduktion der ENDM um 35% zu beobachten. Auch Bezafibrat-Glycinat-Methylester verminderte den Substratumsatz ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  signifikant, der maximale Hemmeffekt betrug aber ebenfalls nur 30%.

Auch **Fenofibrat** hatte nur einen geringen Einfluß auf die ENDM. So war zwar bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine signifikante Verringerung des Substratumsatzes zu beobachten, das Ausmaß der Hemmung betrug jedoch nur maximal 10%. Fenofibrat-Glycinat bewirkte erst ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  einen signifikant verminderten Substratumsatz, der maximale Hemmeffekt betrug jedoch immerhin 50%. Fenofibrat-Glycinat-Methylester reduzierte die ENDM bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  signifikant. Die Verminderung der Enzymaktivität durch diese Substanz war jedoch wiederum nur sehr gering ausgeprägt und betrug bei 1000  $\mu\text{M}$  lediglich 25%.

**Gemfibrozil** reduzierte die ENDM-Aktivität ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  signifikant. Die Hemmwirkung durch diese Substanz war ebenfalls gering. Sie betrug bei der maximalen Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  ca. 30%. Auch die Verminderung des Substratumsatzes durch Gemfibrozil-Glycinat war nicht sehr ausgeprägt. Zwar fand sich bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine signifikante Hemmung, die Reduktion der Enzymaktivität war jedoch ebenfalls mit 30% auch bei der maximalen Gemfibrozil-Glycinat-Konzentration nur gering. Der Einfluß von Gemfibrozil-Glycinat-Methylester auf die ENDM war fast identisch mit dem des Glycinates.

Insgesamt war die Beeinflussung der ENDM durch alle untersuchten Substanzen nur minimal. Zwar wiesen einige Substanzen bereits ab 1  $\mu\text{M}$  (Clofibrat-Glycinat und Fenofibrat-Glycinat-Methylester) oder 10  $\mu\text{M}$  (Ciprofibrat-Glycinat-Methylester, Bezafibrat-Glycinat, Fenofibrat, Gemfibrozil-Glycinat, Gemfibrozil-Glycinat-Methylester) signifikante Hemmwirkungen auf, die prozentuale Verringerung der Aktivität war jedoch nur sehr gering.



**Abbildung 6:** Einfluß der untersuchten Fibrate in einer Konzentration von 10 µM auf die Ethylmorphin-N-Demethylierung im 9000g-Überstand von Rattenlebern in vitro. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.; n = 6; \*:  $p \leq 0,05$  versus jeweilige zugehörige Kontrolle (= 100%). Cip: Ciprofibrat; Clo: Clofibrat; Bez: Bezafibrat; Fen: Fenofibrat; Gem: Gemfibrozil; G: Glycinat; GM: Glycinat-Methylester.

#### 6.2.6. $\omega$ -Laurinsäure-Hydroxylierung (LAOH)

**Ciprofibrat** verminderte die 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Bildung bei einer Konzentration von 100 und 1000 µM um 35% bzw. 50%. Bei der 12- $\omega$ -Hydroxylierung kam es bei einer Konzentration von 10 µM zu einem Anstieg der Aktivität um 5%, bei 1000 µM betrug die Zunahme des Umsatzes 25%. Die Ergebnisse der mit Ciprofibrat-Glycinat durchgeführten Untersuchungen waren bezüglich der 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Bildung fast identisch mit denen des Ciprofibrates. Die 12- $\omega$ -Hydroxylierung wurde hingegen nicht wie bei der „Muttersubstanz“ erhöht, sondern in der höchsten Konzentration (1000 µM) sogar signifikant um 30% vermindert. Ciprofibrat-Glycinat-Methylester verursachte dagegen bei 100 und 1000 µM eine vermehrte Entstehung sogar beider Reaktionsprodukte der Laurinsäure um maximal ca. 30%.

Der Einfluß von **Clofibrat** auf die 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Bildung konnte leider nicht bestimmt werden, da der Peak der 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure von dem des Clofibrates überlagert wurde. Auch der Peak der 12- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure wurde teilweise vom Peak des Clofibrates überlagert. Bei einer Fibrat-Konzentration von 100 µM wurde bei formaler Auswertung der Peaks eine erhöhte 12- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Bildung registriert, was jedoch als Folge der dicht beieinanderliegenden Peaks gedeutet werden muß. Bei

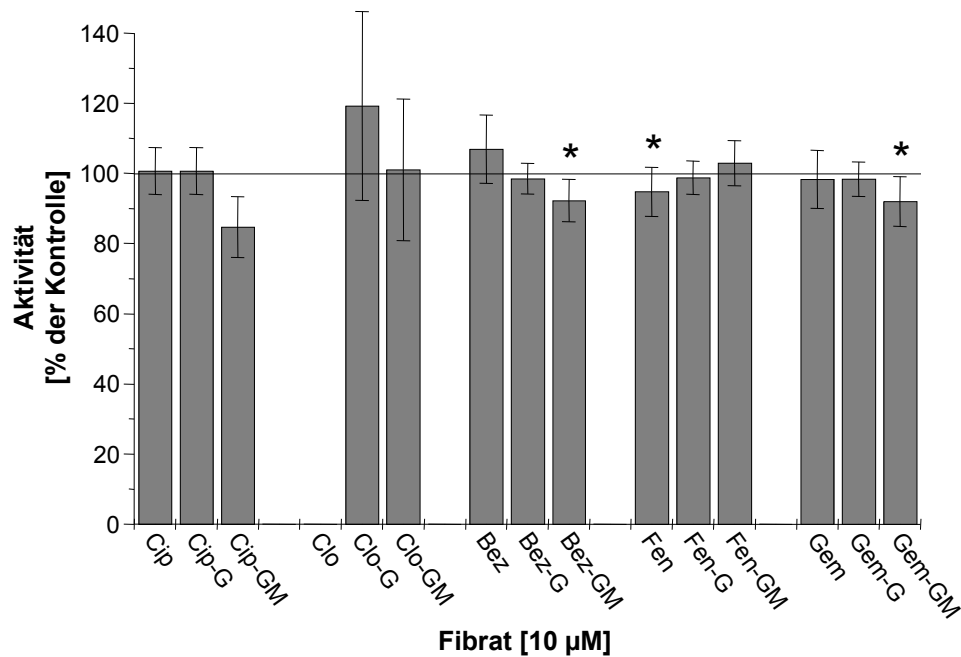
Konzentrationen des Clofibrates  $\leq 10 \mu\text{M}$  hatte die Substanz keinen Einfluß auf den Substratumsatz. Auch mögliche Effekte von Clofibrat-Glycinat auf die 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Bildung waren wegen einer Überlagerung der Peaks nur eingeschränkt meßbar. Auf die 12- $\omega$ -Hydroxylierung hatte Clofibrat-Glycinat keinen Einfluß. Clofibrat-Glycinat-Methylester führte bei einer Konzentration von  $1000 \mu\text{M}$  zu einem Anstieg der 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Bildung um 130%. Die 12- $\omega$ -Hydroxylierung wurde nicht beeinflusst.

Durch **Bezafibrat** wurde die Hydroxylierung der Laurinsäure zu 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure gehemmt. Dieser Effekt trat ab einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  auf. Bei der maximalen Fibrat-Konzentration von  $1000 \mu\text{M}$  betrug die Hemmwirkung 75%. Die Bildung der 12- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure wurde lediglich bei einer Konzentration von  $1000 \mu\text{M}$  signifikant beeinflusst. Hier kam es zu einer Zunahme der Aktivität um 50%. Bezafibrat-Glycinat hatte keinen Effekt auf die Hydroxylierung der Laurinsäure. Dagegen verursachte Bezafibrat-Glycinat-Methylester bereits ab einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  eine Verminderung der Hydroxylierung zur 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure. Der Effekt nahm mit steigender Fibratkonzentration zu, war jedoch insgesamt nicht sehr stark ausgeprägt.  $1000 \mu\text{M}$  Bezafibrat-Glycinat-Methylester führten zu einer Reduktion der Entstehung der 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure um ca. 75%. Die Bildung der 12- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure wurde durch Bezafibrat-Glycinat-Methylester nicht beeinflusst.

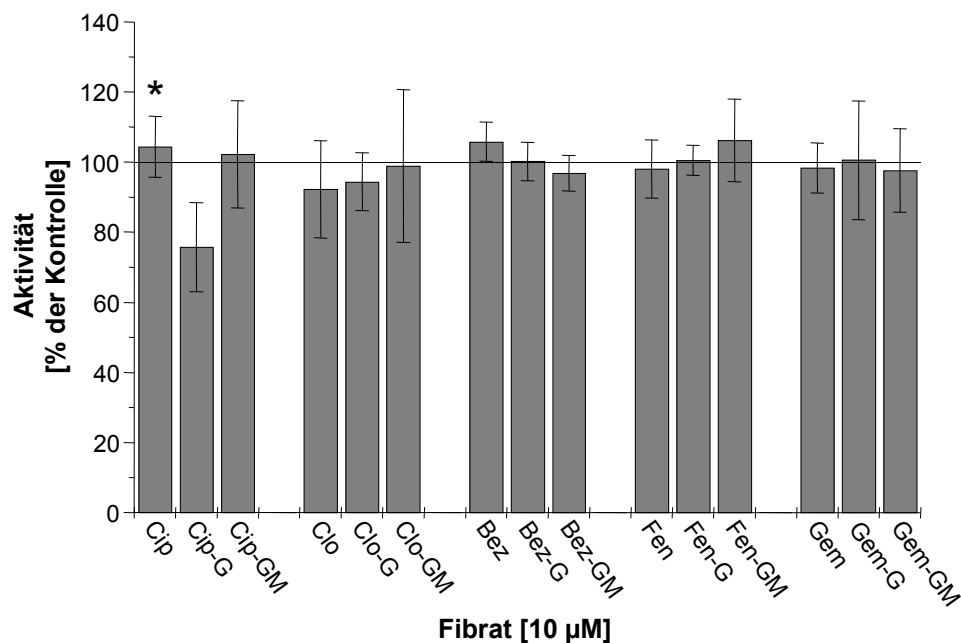
**Fenofibrat** bewirkte eine nur geringe Reduktion der 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Bildung. Diese Hemmung war zwar ab einer Fenofibrat-Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  signifikant, betrug jedoch nur maximal 11%. Auf die 12- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Entstehung hatte Fenofibrat keinen Einfluß. Die Reduktion der 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Bildung durch Fenofibrat-Glycinat war zwar stärker ausgeprägt als die der „Muttersubstanz“, trat jedoch nur bei der höchsten Konzentration von  $1000 \mu\text{M}$  auf. Die Aktivität wurde hierbei um ca. 60% vermindert. Die Bildung der 12- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure wurde dagegen bei dieser Fenofibrat-Glycinat-Konzentration um 45% gesteigert. Geringere Konzentrationen hatte keinen Effekt. Auch Fenofibrat-Glycinat-Methylester führte ab einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  zu einer signifikanten Reduktion der 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Entstehung. Insgesamt war der Hemmeffekt mit 35% jedoch nicht so stark ausgeprägt wie durch das Fenofibrat-Glycinat. Weiterhin wurde durch Fenofibrat-Glycinat-Methylester, im Gegensatz zur „Muttersubstanz“ und dessen Glycinat, auch die Bildung der 12- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure vermindert, jedoch nur bei einer Konzentration von  $1000 \mu\text{M}$  und um 30%.

**Gemfibrozil** verringerte die Bildung der 11- und 12- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure ab einer Konzentration von 100  $\mu$ M. Hierbei wurde die 11- $\omega$ -Hydroxylierung um maximal 40% und die 12- $\omega$ -Hydroxylierung um maximal 30% gehemmt. Gemfibrozil-Glycinat reduzierte die Entstehung der 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure ebenfalls ab einer Konzentration von 100  $\mu$ M. Der Effekt war jedoch mit einer maximalen Hemmung um 70% deutlich stärker ausgeprägt als beim Gemfibrozil. Im Gegensatz zu „Muttersubstanz“ beeinflusste Gemfibrozil-Glycinat die Bildung der 12- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure nicht. Gemfibrozil-Glycinat-Methylester führte wie Gemfibrozil zu einer Verminderung der Entstehung beider Hydroxylierungsprodukte. Die Wirkung auf die 11- $\omega$ -Hydroxylierung war mit einem maximalen Hemmeffekt von 95% deutlicher als beim Gemfibrozil und dessen Glycinat. Auch wurde bereits bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M eine geringe Verminderung der Enzym-Aktivität registriert. Der Einfluß von Gemfibrozil-Glycinat-Methylester auf die 12- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Bildung war dagegen nur sehr schwach ausgeprägt (maximale Hemmung um 10%) und erst ab einer Fibrat-Konzentration von 100  $\mu$ M signifikant.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß nur drei der untersuchten Substanzen (Bezafibrat-Glycinat-Methylester, Fenofibrat und Gemfibrozil-Glycinat-Methylester) die Bildung der 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M signifikant verringerten. Keines der Fibrate bewirkte einen Effekt bei geringeren Konzentrationen. Der Einfluß auf die Bildung der 12- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure war noch geringer. Keine der untersuchten Substanzen verursachte bei einer Konzentration von  $\leq 10$   $\mu$ M einen signifikanten Hemmeffekt.



**Abbildung 7:** Einfluß der untersuchten Fibrate in einer Konzentration von 10 µM auf die 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Bildung im 9000g-Überstand von Rattenlebern in vitro. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.; n = 6; \*:  $p \leq 0,05$  versus jeweilige zugehörige Kontrolle (= 100%). Cip: Ciprofibrat; Clo: Clofibrat; Bez: Bezafibrat; Fen: Fenofibrat; Gem: Gemfibrozil; G: Glycinat; GM: Glycinat-Methylester.



**Abbildung 8:** Einfluß der untersuchten Fibrate in einer Konzentration von 10 µM auf die 12- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Bildung im 9000g-Überstand von Rattenlebern in vitro. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.; n = 6; \*:  $p \leq 0,05$  versus jeweilige zugehörige Kontrolle (= 100%). Cip: Ciprofibrat; Clo: Clofibrat; Bez: Bezafibrat; Fen: Fenofibrat; Gem: Gemfibrozil; G: Glycinat; GM: Glycinat-Methylester.



### 6.3. Einfluß der untersuchten Substanzen auf die Oxidasefunktion des Cytochrom P450

#### 6.3.1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in Lebermikrosomen

**Ciprofibrat** verringerte die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung ab einer Konzentration von 100 µM signifikant, jedoch nur maximal um 10%. Bei Ciprofibrat-Glycinat kam es bereits bei einer Konzentration von 10 µM zu einer signifikanten Verminderung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Entstehung. Die maximale Hemmwirkung war mit 20% jedoch nur wenig stärker als die von Ciprofibrat. Ciprofibrat-Glycinat-Methylester beeinflusste dagegen diese Modellreaktion prozentual deutlicher als die „Muttersubstanz“ und deren Glycinat. So verringerte sich die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung bei Konzentrationen von 100 und 1000 µM um 50% bzw. 60%.

**Clofibrat** hatte keinen Einfluß auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Entstehung. Clofibrat-Glycinat dagegen hemmte die Modellreaktion bereits ab einer Konzentration von 1 µM signifikant. Der Effekt war mit maximal 10% jedoch nur sehr gering. Am deutlichsten war die Reduktion der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung durch Clofibrat-Glycinat-Methylester. Eine signifikante Hemmung der Modellreaktion fand sich zwar erst ab einer Fibrat-Konzentration von 100 µM, sie betrug aber bei 1000 µM 40%. Somit hatte wie bei den Ciprofibrat-Verbindungen auch bei den Clofibrat-Derivaten der Glycinat-Methylester den prozentual größten Einfluß auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung.

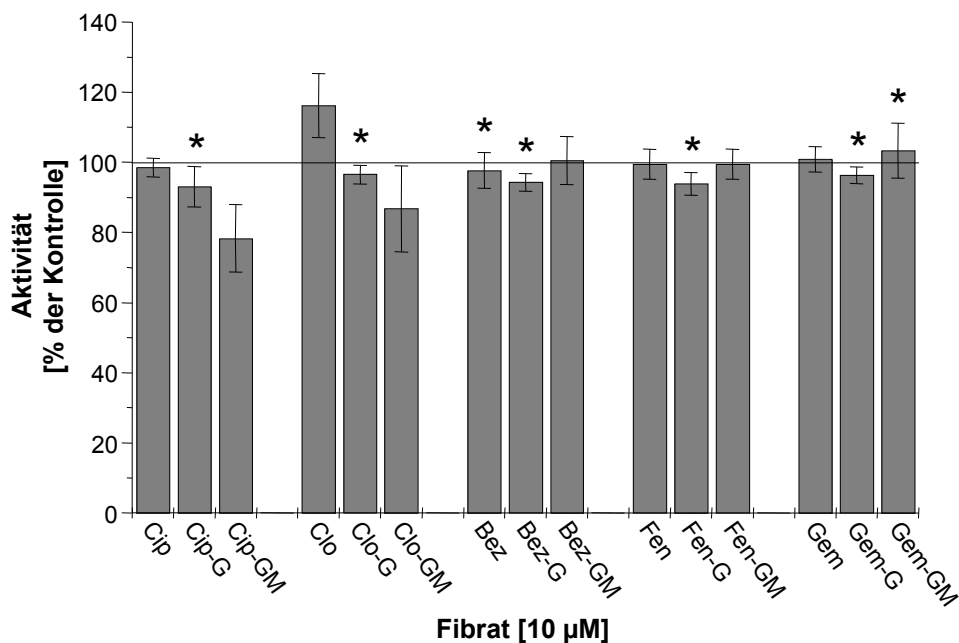
Sowohl **Bezafibrat** als auch Bezafibrat-Glycinat führten bereits ab einer Konzentration von 10 µM zu einer signifikanten Verminderung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Entstehung. Auch hier war jedoch die maximale Hemmwirkung mit ca. 20% nur gering. Ähnliche Ergebnisse brachten die Versuche mit Bezafibrat-Glycinat-Methylester. Auch hier lag der Hemmeffekt bei einer Konzentration von 1000 µM nur bei ca. 20%. Die bei den Substanzen Ciprofibrat und Clofibrat beobachtete, im Vergleich zur „Muttersubstanz“ stärkere Hemmwirkung der Glycinat-Methylester-Verbindungen war beim Bezafibrat-Glycinat-Methylester somit nicht zu beobachten.

**Fenofibrat** und Fenofibrat-Glycinat-Methylester hatten fast keinen Einfluß auf die Modellreaktion. Lediglich bei der höchsten Fibrat-Konzentration kam es zu einer leichten Reduktion der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung um 20%. Die Hemmung durch Fenofibrat-Glycinat war dagegen stärker ausgeprägt. So wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Entstehung bereits ab einer Konzentration von 10 µM signifikant verringert und der maximale Hemmeffekt betrug 40%.

Ab einer **Gemfibrozil**-Konzentration von 100 µM kam es zu einer leicht vermehrten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung. Bei der maximalen Konzentration von 1000 µM entstand im Vergleich zur Kontrolle ca. 20% mehr H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Gemfibrozil-Glycinat dagegen verringerte die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Entstehung. Dieser Effekt war zwar ab einer Konzentration von 10 µM signifikant, mit maximal 10% jedoch

nicht sehr deutlich ausgeprägt. Auch durch Gemfibrozil-Glycinat-Methylester kam es, wie bei der „Muttersubstanz“ Gemfibrozil zu einer vermehrten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung. Dieser Effekt trat bei Substanz-Konzentrationen von 10 und 100  $\mu\text{M}$  auf und betrug maximal 20%. Bei Konzentrationen von 1 und 1000  $\mu\text{M}$  wurde die Entstehung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht beeinflusst.

Es läßt sich zusammenfassen, daß Gemfibrozil und Gemfibrozil-Glycinat-Methylester die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung zumindest bei bestimmten Konzentrationen erhöhten. Alle anderen Fibrat-Derivate hemmten diese Modellreaktion insgesamt nur schwach bzw. gar nicht (Clofibrat).



**Abbildung 9:** Einfluß der untersuchten Fibrate in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung in Mikrosomensuspensionen von Rattenlebern in vitro. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.; n = 6; \*:  $p \leq 0,05$  versus jeweilige zugehörige Kontrolle (= 100%). Cip: Ciprofibrat; Clo: Clofibrat; Bez: Bezafibrat; Fen: Fenofibrat; Gem: Gemfibrozil; G: Glycinat; GM: Glycinat-Methylester.

### 6.3.2. NADPH/ $\text{Fe}^{2+}$ -stimulierte Lipidperoxidation (LPO)

**Ciprofibrat**, sein Glycinat sowie die Glycinat-Methylester-Verbindung hatten nur einen sehr geringen Einfluß auf die LPO. Lediglich bei hohen Fibrat-Konzentrationen ( $\geq 100 \mu\text{M}$ ) kam es zu einer geringen Verminderung der LPO um maximal 10%.

Bei **Clofibrat** wurde eine deutliche Hemmung der Modellreaktion bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  beobachtet. Bei 1000  $\mu\text{M}$  betrug die Reduktion 40%. Clofibrat-Glycinat verminderte die LPO erst ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  und maximal um 10%.

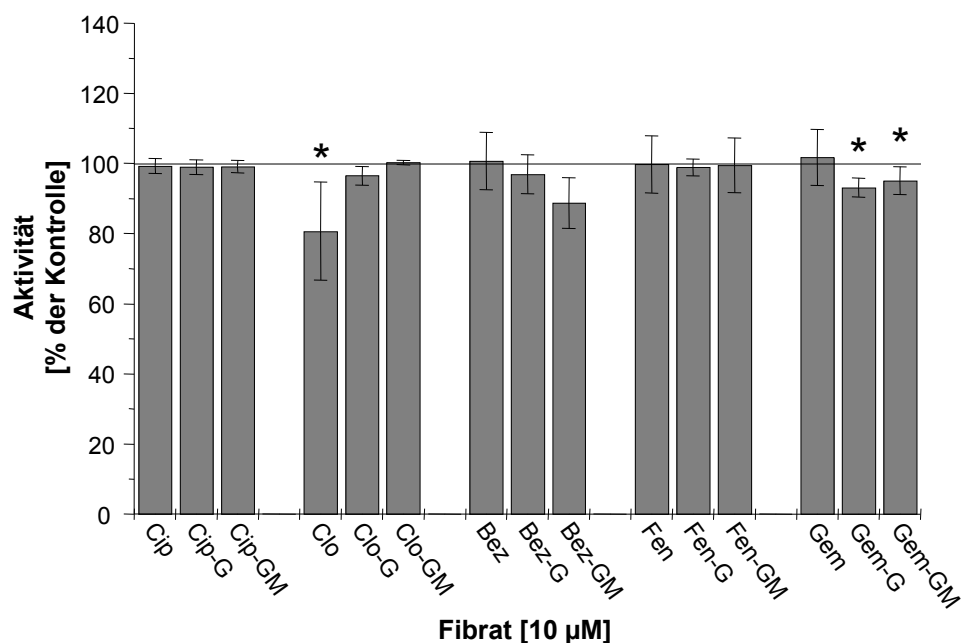
Clofibrat-Glycinat-Methylester hatte keinen Einfluß auf die Modellreaktion. Damit unterschieden sich die beiden Derivate des Clofibrates deutlich von der „Muttersubstanz“.

**Bezafibrat** und seine Glycinat-Verbindung beeinflussten die Modellreaktion nicht. Bezafibrat-Glycinat-Methylester dagegen hemmte die LPO bei 100 und 1000  $\mu\text{M}$  um 20% bzw. 30%.

**Fenofibrat** und Fenofibrat-Glycinat-Methylester hatten keinen Einfluß auf die LPO. Bei Fenofibrat-Glycinat wurde nur bei der höchsten Konzentration (1000  $\mu\text{M}$ ) eine geringe Verminderung der gemessenen TBARS um weniger als 10% registriert.

Auch **Gemfibrozil** bewirkte nur eine geringe Reduktion der LPO bei 100 und 1000  $\mu\text{M}$  um maximal 20%. Die Hemmung der Modellreaktion durch Gemfibrozil-Glycinat und vor allem Gemfibrozil-Glycinat-Methylester war deutlich stärker. Eine signifikante Verminderung der LPO wurde bereits bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  beobachtet. Die gemessenen TBARS verringerten sich bei der maximalen Fibrat-Konzentration (1000  $\mu\text{M}$ ) um 20% bzw. 40%.

Insgesamt fand sich bei keiner der neu synthetisierten Substanzen ein relevanter Unterschied zur „Muttersubstanz“. Clofibrat, Gemfibrozil-Glycinat und Gemfibrozil-Glycinat-Methylester zeigten die deutlichsten Effekte auf diese Modellreaktion. Alle anderen untersuchten Substanzen beeinflussten sie nicht oder nicht nennenswert.



**Abbildung 10:** Einfluß der untersuchten Fibrate in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf die stimulierte Lipidperoxidation in Mikrosomensuspensionen von Rattenlebern in vitro. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.; n = 6; \*:  $p \leq 0,05$  versus jeweilige zugehörige Kontrolle (= 100%). Cip: Ciprofibrat; Clo: Clofibrat; Bez: Bezafibrat; Fen: Fenofibrat; Gem: Gemfibrozil; G: Glycinat; GM: Glycinat-Methylester.

### 6.3.3. Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz in Lebermikrosomen (LCCL)

Durch **Ciprofibrat** konnte auch in der höchsten Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  kein signifikanter Effekt auf die LCCL erzielt werden. Ebenso hatte Ciprofibrat-Glycinat nur einen geringen Einfluß auf diese Modellreaktion. Es reduzierte die gemessenen Lichtimpulse erst ab einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  signifikant und lediglich um 10%. Mit Ciprofibrat-Glycinat-Methylester wurde zwar ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine signifikante Verminderung der Photoemissionen erreicht, aber auch hier zeigte sich nur eine Hemmung um maximal 15%.

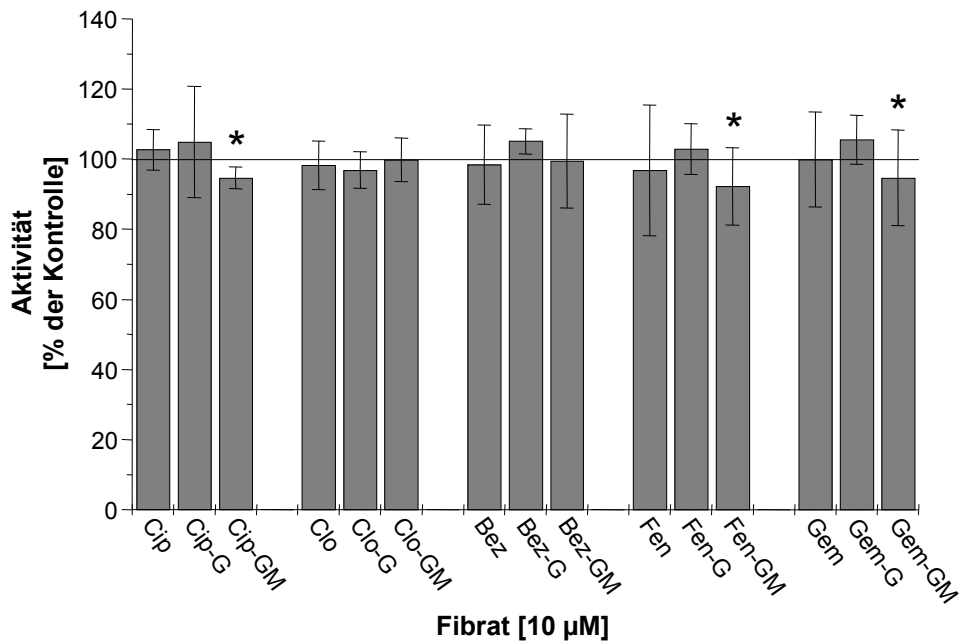
**Clofibrat** und seine Derivate Clofibrat-Glycinat und Clofibrat-Glycinat-Methylester hatten keinen Einfluß auf die LCCL.

Auch **Bezafibrat** beeinflusste die Modellreaktion nicht. Bezafibrat-Glycinat führte ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zu einem leichten Anstieg der gemessenen Lichtimpulse. Bei einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  betrug die Erhöhung der registrierten Photoemissionen 20%. Bezafibrat-Glycinat-Methylester hatte wiederum keinen Einfluß auf die LCCL.

Ebenfalls keine Wirkung auf die Modellreaktion hatte **Fenofibrat**. Auch bei Fenofibrat-Glycinat war bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  kein Effekt zu beobachten. Bei 1000  $\mu\text{M}$  kam es jedoch zu einer deutlichen Verminderung der gemessenen Lichtimpulse um ca. 50%. Die Hemmung der LCCL durch Fenofibrat-Glycinat-Methylester war noch stärker ausgeprägt als beim Glycinat. Ein signifikanter Effekt war bereits bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu sehen, bei 1000  $\mu\text{M}$  betrug die Hemmwirkung 60%.

Keinen Effekt auf die LCCL hatten auch **Gemfibrozil** und sein Glycinat. Gemfibrozil-Glycinat-Methylester dagegen verringerte die gezählten Lichtimpulse signifikant ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Bei einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  lag die Hemmwirkung bei 40%.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß nur eine der untersuchten Substanzen (Bezafibrat-Glycinat) eine signifikante Erhöhung der durch die LCCL gemessenen Radikale, wenn auch nur in einem geringen Ausmaß, verursachte. Drei Substanzen (Ciprofibrat-Glycinat-Methylester, Fenofibrat-Glycinat-Methylester und Gemfibrozil-Glycinat-Methylester) verminderten die Bildung der gemessenen Radikale ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Die anderen Substanzen beeinflussten die LCCL nicht oder nur gering.



**Abbildung 11:** Einfluß der untersuchten Fibrate in einer Konzentration von 10 µM auf die Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz in Mikrosomensuspensionen von Rattenlebern in vitro. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.; n = 6; \*:  $p \leq 0,05$  versus jeweilige zugehörige Kontrolle (= 100%). Cip: Ciprofibrat; Clo: Clofibrat; Bez: Bezafibrat; Fen: Fenofibrat; Gem: Gemfibrozil; G: Glycinat; GM: Glycinat-Methylester.

#### 6.3.4. Luminol-verstärkte Chemilumineszenz in Lebermikrosomen (LMCL)

Wurde Luminol als Verstärkersubstanz eingesetzt, reichte im Vergleich zur LCCL für die meisten der untersuchten Substanzen eine deutlich geringere Konzentrationen aus, um eine signifikante Verminderung der Lichtimpulse zu erreichen.

**Ciprofibrat** hatte bis zu einer Konzentration von 100 µM keinen Einfluß auf diese Modellreaktion. Bei einer Konzentration von 1000 µM wurde jedoch eine Hemmung um 40% gemessen. Ciprofibrat-Glycinat verminderte die registrierten Photoemissionen bereits ab einer Konzentration von 10 µM signifikant um 10%. Bei der höchsten Konzentration von Ciprofibrat-Glycinat (1000 µM) lag die Hemmwirkung bei ca. 35%. Die Effekte durch Ciprofibrat-Glycinat-Methylester waren noch deutlicher ausgeprägt. Bei einer Konzentration von 10 µM betrug die Hemmwirkung bereits 30%. Bei maximaler Konzentration (1000 µM) wurde die LMCL um 40% reduziert.

**Clofibrat** beeinflusste die Modellreaktion nicht. Dagegen verminderte Clofibrat-Glycinat die registrierten Lichtimpulse ab einer Konzentration von 10 µM signifikant um 10%. Bei einer Konzentration von 1000 µM betrug die Reduktion der LMCL 40%. Clofibrat-Glycinat-Methylester hatte dagegen wiederum fast keinen Einfluß auf die Modellreaktion. Lediglich bei

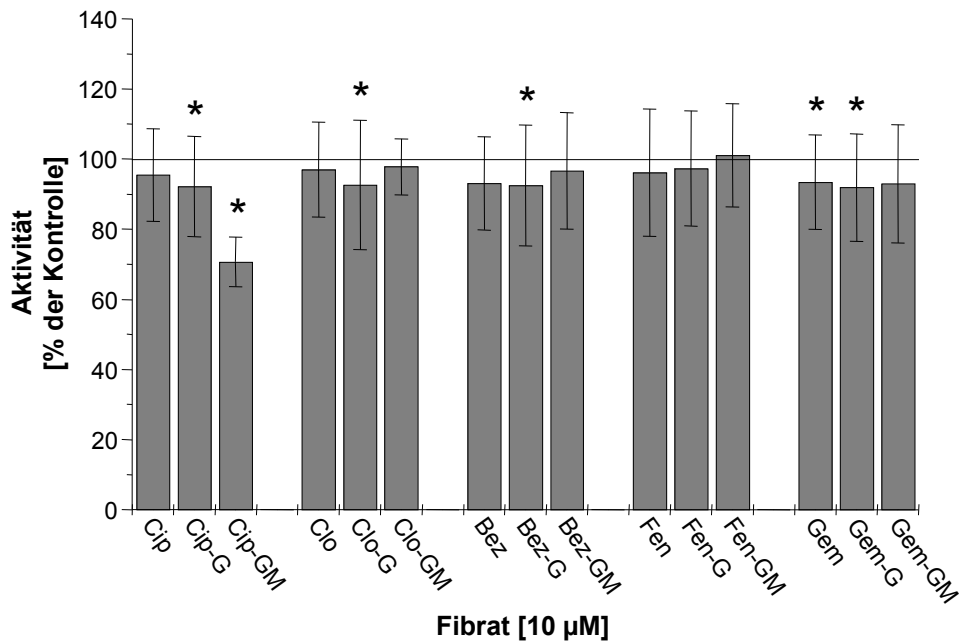
der höchsten Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  kam es zu einer geringen Verminderung der gemessenen Lichtimpulse um 20%.

**Bezafibrat** bewirkte bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eine signifikante Verminderung der durch die LMCL gemessenen Radikale um 15%. Bei 1000  $\mu\text{M}$  lag die Reduktion der registrierten Impulse bei 35%. Bezafibrat-Glycinat verursachte nur eine geringe Abnahme der gemessenen Photoemissionen um maximal 10%. Dieser Effekt war trotz seines geringen Ausmaßes bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  signifikant. Bezafibrat-Glycinat-Methylester beeinflusste die LMCL nicht.

Auch **Fenofibrat** und Fenofibrat-Glycinat-Methylester hatten keinen Einfluß auf die Modellreaktion. Bei Fenofibrat-Glycinat kam es hingegen ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten, wenn auch geringen Verminderung der gemessenen Lichtimpulse. Bei 1000  $\mu\text{M}$  betrug die Hemmwirkung 30%.

Verglichen mit den anderen untersuchten Substanzen verminderte **Gemfibrozil** die LMCL am stärksten. Bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  kam es zu einer signifikanten Reduktion der registrierten Lichtimpulse. Bei Konzentrationen von  $\leq 10$   $\mu\text{M}$  war die Hemmung der LMCL nur gering (um ca. 10%), bei höheren Konzentrationen war der Effekt jedoch deutlicher (um ca. 35% bei 1000  $\mu\text{M}$ ). Vergleichbar waren die Ergebnisse mit Gemfibrozil-Glycinat. Eine signifikante Reduktion der gemessenen Photoemissionen um ca. 10% trat bei Konzentrationen von 10 und 100  $\mu\text{M}$  auf, während bei 1000  $\mu\text{M}$  wiederum eine deutlichere Verminderung der registrierten Lichtimpulse um ca. 40% zu beobachten war. Gemfibrozil-Glycinat-Methylester hatte keinen Effekt auf die LMCL.

Abschließend läßt sich feststellen, daß nur Gemfibrozil in der Lage war, die LMCL ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  signifikant zu hemmen. Ciprofibrat-Glycinat, Ciprofibrat-Glycinat-Methylester, Clofibrat-Glycinat, Bezafibrat-Glycinat und Gemfibrozil-Glycinat verminderten die LMCL ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  signifikant. Alle anderen untersuchten Substanzen hatten keinen oder nur einen geringen Einfluß.



**Abbildung 12:** Einfluß der untersuchten Fibrate in einer Konzentration von 10 µM auf die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz in Mikrosomensuspensionen von Rattenlebern in vitro. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.; n = 6; \*:  $p \leq 0,05$  versus jeweilige zugehörige Kontrolle (= 100%). Cip: Ciprofibrat; Clo: Clofibrat; Bez: Bezafibrat; Fen: Fenofibrat; Gem: Gemfibrozil; G: Glycinat; GM: Glycinat-Methylester.

#### 6.4. Chemilumineszenz im Rattenvollblut (VBCL)

**Ciprofibrat** beeinflusste die VBCL erst ab einer Konzentration von 100 µM. Die Hemmwirkung betrug hierbei 60%. Bei einer Konzentration von 1000 µM war der Effekt so stark, daß keine Lichtimpulse mehr registriert wurden. Auch Ciprofibrat-Glycinat verringerte die gemessenen RLU erst ab einer Konzentration von 100 µM. Hierbei kam es zu einer Reduktion der registrierten Lichtimpulse um 80%. Bei 1000 µM konnten ebenfalls keine Radikale mehr gemessen werden. Der Einfluß des Ciprofibrat-Glycinat-Methylesters war deutlich geringer als der von Ciprofibrat und dessen Glycinat. Bei 100 und 1000 µM wurde die VBCL um 20% bzw. 50% reduziert.

Auch **Clofibrat** führte nur bei hohen Konzentrationen zu einer starken Verminderung der durch die VBCL gemessenen Radikale. Bei 100 und 1000 µM betrug die Hemmwirkung 40% bzw. 90%. Clofibrat-Glycinat hatte bis zu einer Konzentration von 100 µM keinen signifikanten Einfluß auf die Modellreaktion. Bei einer Konzentration von 1000 µM wurde jedoch eine Reduktion der VBCL um über 90% registriert. Auch Clofibrat-Glycinat-Methylester beeinflusste bis zu einer Konzentration von 100 µM die Modellreaktion nicht. Bei 1000 µM kam es lediglich zu einer Hemmung der VBCL um ca. 50%.

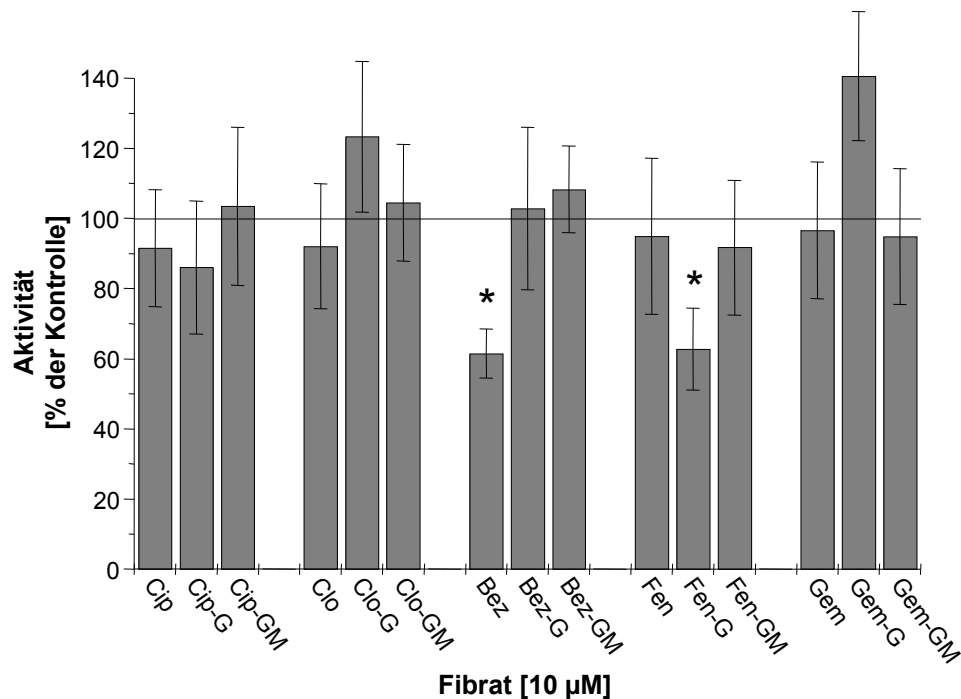
**Bezafibrat** führte zu einer relativ starken Verminderung der gemessenen Radikale. Bereits bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  betrug die Hemmwirkung 40%, bei der maximalen Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  waren es mehr als 90%. Der Einfluß von Bezafibrat-Glycinat auf die VBCL war geringer als der von Bezafibrat. Erst Konzentrationen von 100 und 1000  $\mu\text{M}$  führten zu einer Verminderung der gemessenen Lichtimpulse um 40 bzw. 90%. Im Gegensatz zu Bezafibrat und dessen Glycinat-Verbindung hatte Bezafibrat-Glycinat-Methylester keinen Einfluß auf die Modellreaktion.

**Fenofibrat** beeinflusste die VBCL nicht. Sein Glycinat führte hingegen zu einer deutlichen Verminderung der gemessenen Radikale. Bereits bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  wurde die VBCL um 40% reduziert. Die maximale Konzentration (1000  $\mu\text{M}$ ) verringerte die gemessenen Radikale um über 90%. Fenofibrat-Glycinat-Methylester führte bei Konzentrationen von 100 und 1000  $\mu\text{M}$  zu einer Verminderung der registrierten Lichtimpulse um ca. 40%.

**Gemfibrozil** bewirkte bei Konzentrationen von 100 und 1000  $\mu\text{M}$  eine signifikante Reduktion der gemessenen Radikale um 30% bzw. 80%. Mit Gemfibrozil-Glycinat kam es bei Konzentrationen von  $\leq 100$   $\mu\text{M}$  zu einem Anstieg der VBCL. Dieser Effekt war nicht signifikant, es wurden jedoch Werte ermittelt, die ca. 50% über den Kontrollwerten lagen. Bei einer Konzentration des Fibrats von 1000  $\mu\text{M}$  wurde hingegen eine fast vollständige Hemmung der VBCL registriert. Gemfibrozil-Glycinat-Methylester führte lediglich bei 1000  $\mu\text{M}$  zu einer Reduktion der gemessenen Lichtimpulse um 60%.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die meisten der untersuchten Substanzen (Ciprofibrat, Ciprofibrat-Glycinat, Ciprofibrat-Glycinat-Methylester, Clofibrat, Clofibrat-Glycinat, Clofibrat-Glycinat-Methylester, Bezafibrat-Glycinat, Fenofibrat-Glycinat-Methylester, Gemfibrozil, Gemfibrozil-Glycinat und Gemfibrozil-Glycinat-Methylester) bei hohen Konzentrationen ( $\geq 100$   $\mu\text{M}$ ) eine starke und signifikante Verringerung der bei der Phagozytose entstehenden Radikale bewirkten. Bezafibrat und Fenofibrat-Glycinat hemmten die Entstehung der durch diese Modellreaktion gemessenen Radikale am stärksten und bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Zwei der Substanzen (Bezafibrat-Glycinat-Methylester und Fenofibrat) hatten keinen Effekt auf die VBCL.





**Abbildung 13:** Einfluß der untersuchten Fibrate in einer Konzentration von 10 µM auf die Chemilumineszenz im Rattenvollblut. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.; n = 6; \*:  $p \leq 0,05$  versus jeweilige zugehörige Kontrolle (= 100%). Cip: Ciprofibrat; Clo: Clofibrat; Bez: Bezafibrat; Fen: Fenofibrat; Gem: Gemfibrozil; G: Glycinat; GM: Glycinat-Methylester.

## 6.5. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die Ergebnisse der durchgeführten Modellreaktionen. Dabei wird dargestellt, ab welcher Konzentration es zu einem signifikanten Effekt auf die jeweilige Modellreaktion kam. Die Stärke der Hemmung oder Steigerung geht daraus nicht hervor. Sie wird aus den im Anhang dargestellten Diagrammen der Versuchsergebnisse deutlich.

**Tabelle 4:** Das Bindungsverhalten an das Cytochrom P450.

Typ I: Hexobarbital-Typ; Typ II: Anilin-Typ. Die in Klammern gesetzten römischen Ziffern stehen für eine schwache Bindung.

Substanz	Wellenberg [nm]	Wellental [nm]	Bindungs- typ
Ciprofibrat	428	389	(II)
Ciprofibrat-Glycinat	387	420	I
Ciprofibrat-Glycinat-Methylester	387	424	I
Clofibrat	419	382	II
Clofibrat-Glycinat	412	435	(I)
Clofibrat-Glycinat-Methylester	388	420	I
Bezafibrat	424	387	II
Bezafibrat-Glycinat	421	384	II
Bezafibrat-Glycinat-Methylester	420	386	II
Fenofibrat	424	388	(II)
Fenofibrat-Glycinat	421	389	II
Fenofibrat-Glycinat-Methylester	423	387	II
Gemfibrozil	385	418	I
Gemfibrozil-Glycinat	386	421	I
Gemfibrozil-Glycinat-Methylester	392	427	I

**Tabelle 5:** Die Wirkung der verschiedenen Fibrate auf die Monooxygenasefunktion des Cytochrom P450. Die Symbole haben folgende Bedeutung:

Signifikante Hemmung:

↓↓↓↓: ab 1 µM; ↓↓↓: ab 10 µM; ↓: ab 100 µM; (↓): ab 1000 µM.

Signifikante Steigerung:

↑↑↑↑: ab 1 µM; ↑↑↑: ab 10 µM; ↑: ab 100 µM; (↑): ab 1000 µM.

⊗: kein Effekt.

(\*): Signifikante Hemmung nur bei 10 und 100 µM.

Substanz	EROD	ECOD	PROD	p-NPH	ENDM	LAOH (11-ω- Hydr.-L.)	LAOH (12-ω- Hydr.-L.)
Ciprofibrat	(↓)	↓	(↓)	⊗	(↓)	↓	↑↑↑
Ciprofibrat-Glycinat	↓	↓	↓↓↓	↓	↓	↓	(↓)
Ciprofibrat-Glycinat-Methylester	↓	↓↓↓↓	↓↓↓	↓	↓↓↓	↑	↑
Clofibrat	⊗	⊗(*)	⊗	↓	(↓)	nicht auswertbar	⊗
Clofibrat-Glycinat	(↓)	↓	(↓)	⊗	↓↓↓↓	nicht auswertbar	⊗
Clofibrat-Glycinat-Methylester	(↓)	(↓)	(↓)	⊗	(↓)	(↑)	⊗
Bezafibrat	(↓)	(↓)	⊗	↓↓↓	↓	↓	(↑)
Bezafibrat-Glycinat	↓	↓	⊗	(↓)	↓↓↓	⊗	⊗
Bezafibrat-Glycinat-Methylester	↓	↓	↓	(↓)	↓	↓↓↓	⊗
Fenofibrat	↓↓↓	↓↓↓	⊗	⊗	↓↓↓	↓↓↓	⊗
Fenofibrat-Glycinat	↓↓↓	(↓)	(↓)	(↑)	↓	(↓)	(↑)
Fenofibrat-Glycinat-Methylester	↓↓↓	↓↓↓↓	↓↓↓↓	(↓)	↓↓↓↓	(↓)	(↓)
Gemfibrozil	↓	↓	↓↓↓	⊗	↓	↓	↓
Gemfibrozil-Glycinat	(↓)	↓	(↓)	⊗	↓↓↓	↓	⊗
Gemfibrozil-Glycinat-Methylester	↓	↓↓↓	↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓

**Tabelle 6:** Die Wirkung der verschiedenen Fibrate auf die Oxidasefunktion des Cytochrom P450. Die Symbole haben folgende Bedeutung:

Signifikante Hemmung:

↓↓↓↓: ab 1 µM; ↓↓↓: ab 10 µM; ↓: ab 100 µM; (↓): ab 1000 µM.

Signifikante Steigerung:

↑↑↑↑: ab 1 µM; ↑↑↑: ab 10 µM; ↑: ab 100 µM; (↑): ab 1000 µM.

⊗: kein Effekt.

Substanz	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Bildung	LPO	LCCL	LMCL
Ciprofibrat	↓	↓	⊗	(↓)
Ciprofibrat-Glycinat	↓↓↓	↓	(↓)	↓↓↓
Ciprofibrat-Glycinat-Methylester	↓	↓	↓↓↓	↓↓↓
Clofibrat	⊗	↓↓↓	⊗	⊗
Clofibrat-Glycinat	↓↓↓↓	↓	⊗	↓↓↓
Clofibrat-Glycinat-Methylester	↓	⊗	⊗	(↓)
Bezafibrat	↓↓↓	⊗	⊗	↓
Bezafibrat-Glycinat	↓↓↓	⊗	↑	↓↓↓
Bezafibrat-Glycinat-Methylester	↓	↓	⊗	⊗
Fenofibrat	(↓)	⊗	⊗	⊗
Fenofibrat-Glycinat	↓↓↓	(↓)	(↓)	↓
Fenofibrat-Glycinat-Methylester	(↓)	⊗	↓↓↓	⊗
Gemfibrozil	↑	↓	⊗	↓↓↓↓
Gemfibrozil-Glycinat	↓↓↓	↓↓↓	⊗	↓↓↓
Gemfibrozil-Glycinat-Methylester	↑↑	↓↓↓	↓↓↓	⊗

**Tabelle 7:** Die Wirkung der verschiedenen Fibrat-Derivate auf die Chemilumineszenz im Rattenvollblut. Die Symbole haben folgende Bedeutung:

Signifikante Hemmung:

↓↓↓↓: ab 1 µM; ↓↓↓: ab 10 µM; ↓↓: ab 100 µM; (↓↓): ab 1000 µM.

⊗: kein Effekt.

Ciprofibrat	↓↓
Ciprofibrat-Glycinat	↓↓
Ciprofibrat-Glycinat-Methylester	↓↓
Clofibrat	↓↓
Clofibrat-Glycinat	(↓↓)
Clofibrat-Glycinat-Methylester	(↓↓)
Bezafibrat	↓↓↓
Bezafibrat-Glycinat	↓↓
Bezafibrat-Glycinat-Methylester	⊗
Fenofibrat	⊗
Fenofibrat-Glycinat	↓↓↓
Fenofibrat-Glycinat-Methylester	↓↓
Gemfibrozil	↓↓
Gemfibrozil-Glycinat	(↓↓)
Gemfibrozil-Glycinat-Methylester	(↓↓)

## 7. DISKUSSION

In der vorgelegten Arbeit sollten mögliche Interaktionen von zehn neu am Institut für Pharmazie der FSU Jena synthetisierten Fibrat-Derivaten sowie deren „Muttersubstanzen“ Ciprofibrat, Clofibrat, Bezafibrat, Fenofibrat und Gemfibrozil mit dem P450-System in vitro vergleichend untersucht werden.

Hierzu wurde das spektrale Bindungsverhalten an das P450 ermittelt, um festzustellen, ob diese Substanzen überhaupt eine Bindung mit dem P450 eingehen und von welcher Art diese ist. Weiterhin wurden verschiedene Monooxygenase-Modellreaktionen durchgeführt, um herauszufinden, welche Isoenzyme des P450 wie stark beeinflusst werden. Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Modellreaktionen läßt sich abschätzen, ob die neu synthetisierten Substanzen hinsichtlich der Interaktionen mit dem P450 günstiger oder nachteiliger als ihre „Muttersubstanzen“ sind.

Im zweiten Teil der Arbeit ging es darum herauszufinden, ob die Substanzen möglicherweise die Bildung von Radikalen durch das P450 steigern oder hemmen können oder ob sie sogar Radikalfänger-Eigenschaften haben. Auch hier war die Frage zu beantworten, ob Vor- oder Nachteile gegenüber den „Muttersubstanzen“ zu erwarten sind. Vorteile wären eine verminderte Bildung von Radikalen durch das P450 oder „echte“ Scavenger-Eigenschaften. Als Nachteil wäre eine vermehrte Bildung von Radikalen anzusehen, da diese eine Ursache von Nebenwirkungen der Substanzen sein könnte.

Um diese Frage zu beantworten, wurde der Einfluß der Substanzen auf verschiedene P450-vermittelte Oxidase-Modellreaktionen untersucht. Im Falle einer verminderten Radikalbildung kann die Methode der Chemilumineszenz im Rattenvollblut helfen die Frage zu klären, auf welche Weise die Beeinflussung der Radikalbildung erfolgt. Da hier Radikale nachgewiesen werden, die bei der Phagozytose durch Leukozyten v.a. durch die NADPH-Oxidase entstehen, ist diese Methode P450-unabhängig. Bei Substanzen, die auch hier die Radikalbildung vermindern, ist es deshalb wahrscheinlich, daß sie „echte“ Scavenger-Eigenschaften haben. Substanzen, die bei dieser Methode nur einen geringen Einfluß haben, bei den anderen Methoden aber die Radikalbildung vermindern, wirken eher durch Interaktion mit dem P450. Es besteht aber durchaus die Möglichkeit, daß eine Substanz sowohl das P450 als auch die NADPH-Oxidase beeinflusst. Bei einer verminderten Radikalbildung sowohl bei der VBCL als auch bei den anderen Modellreaktionen können „echte“ Scavenger-Eigenschaften deshalb nur als wahrscheinlich angenommen werden.

Alle Versuche wurden im Vergleich zu den „Muttersubstanzen“ durchgeführt, um zu sehen, ob die neu synthetisierten Substanzen einen Vorteil hinsichtlich des Einflusses auf die Monooxygenase-Funktion des P450 bzw. bezüglich der Verminderung der Radikalbildung gegenüber den bereits bekannten Pharmaka haben oder ob mit nachteiligen Eigenschaften zu rechnen ist.

Um die praktische Bedeutung der Versuchsergebnisse besser beurteilen zu können, ist es wichtig zu wissen, in welcher Größenordnung die Konzentrationen der Fibrat-Derivate in vivo bei therapeutischer Dosierung liegen und welche pathologischen Zustände zu erhöhten Konzentrationen im Körper führen können.

Alle „Muttersubstanzen“ werden nach oraler Gabe schnell und fast vollständig resorbiert und haben eine hohe Plasmaeiweißbindung (> 99%) (Miller und Spence 1998; Fachinformationen HYPERLIPEN<sup>®</sup>, REGELAN<sup>®</sup>, CEDUR<sup>®</sup>, LIPANTHYL<sup>®</sup>, GEVILON<sup>®</sup>).

**Ciprofibrat** wird einmal täglich in einer Dosis von 100-200 mg verabreicht. Die Plasmaeiweißbindung ist sehr hoch. Sie beträgt für Albumin durchschnittlich 95% und für  $\alpha$ -Globulin 25%. Mit  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin tritt Ciprofibrat nur unspezifisch in Wechselwirkung. Die Bindung liegt bei etwa 10%. Im Gegensatz zu den anderen Fibraten erfolgt bei Ciprofibrat die Elimination nur in sehr geringem Umfang über die Nieren (weniger als 7%). Die Halbwertszeit liegt bei 81 Stunden (Ferry et al. 1989; Czejka 1991; Betteridge 1993; Fachinformation HYPERLIPEN<sup>®</sup>). Ciprofibrat ist in Deutschland nicht zugelassen, jedoch z.B. in der Schweiz unter dem Handelsnamen HYPERLIPEN<sup>®</sup>. Die tägliche Dosis von **Clofibrat** beträgt 1500 mg auf zwei Einzelgaben verteilt. Maximale Plasmakonzentrationen werden beim Menschen etwa 3-6 Stunden nach Verabreichung erreicht. Die Esterbindung wird nach der Resorption gespalten. Bei Clofibrat werden in 24 Stunden ca. 90% der verabreichten Dosis ausgeschieden, 40-70% davon als Glucuronid. Die Halbwertszeit beträgt 12-16 Stunden (Miller und Spence 1998; Fachinformation REGELAN<sup>®</sup>; Micromedex Drugdex). **Bezafibrat** wird einmal täglich in einer Dosierung von 400-600 mg verabreicht. Nach Einmalgabe von 200 mg Bezafibrat bei gesunden Probanden ergibt sich nach 1-2 Stunden ein Plasmaspitzen Spiegel von 8 mg/l. Im menschlichen Serum liegt Bezafibrat zu 94-96% in proteingebundener Form vor. Das scheinbare Verteilungsvolumen beträgt 17 l. Bezafibrat wird zu 95% über die Nieren und zu 3% über die Faeces ausgeschieden. 50% erscheinen hierbei unverändert und 20% als Glucuronid im Harn. Die durchschnittliche Halbwertszeit beträgt 1-2 Stunden (Monk und Todd 1987; Miller und Spence 1998; Fachinformation CEDUR<sup>®</sup>; Micromedex Drugdex). Die Verabreichung von **Fenofibrat** erfolgt verteilt auf drei Einzelgaben in einer Dosis von 300 mg pro Tag. Es wird schnell und

nahezu vollständig resorbiert und zu Fenofibrinsäure hydrolysiert. Bei gesunden Probanden wird nach Einnahme einer Einzeldosis von 300 mg nach 4 Stunden ein maximaler Plasmaspiegel von 15 mg/l erreicht. Fenofibrinsäure ist zu 99% an Proteine, vorwiegend Albumin, gebunden. Die Elimination von Fenofibrat erfolgt zu 60% renal und zu etwa 25% mit der Fäces. Sie ist zweiphasig, die Halbwertszeit der Alpha-Phase beträgt 5 Stunden, die der Beta-Phase 22 Stunden (Balfour et al. 1990; Adkins und Faulds 1997; Fachinformation LIPANTHYL®; Micromedex Drugdex). Die Einnahme von **Gemfibrozil** erfolgt ein- oder zweimal täglich in einer Gesamtdosis von 900 mg. Nach ca. 2 Stunden wird nach Verabreichung einer Einmaldosis von 900 mg ein maximaler Plasmaspiegel von 35 mg/l erreicht. Die Proteinbindung, fast ausschließlich an Albumin, beträgt 99%. Gemfibrozil wird mit einer Halbwertszeit von 1,5 Stunden zu 70% renal und zu 6% über die Fäces vorwiegend als Glucuronid ausgeschieden (Todd und Ward 1988; Miller und Spence 1998; Fachinformation GEVILON®; Micromedex Drugdex).

Pharmakokinetische Untersuchungen mit Fenofibrat (Adkins und Faulds 1997) ergaben bei einer Dosis von 100 mg maximale Plasmakonzentrationen von 4 mg/l (entsprechend etwa 12 µM). Bei einer Plasmaeiweißbindung von >99% ist die Konzentration der freien, nicht an Proteine gebundenen Substanz maximal 1% der Plasmagesamtkonzentration. Die Konzentration des nicht proteingebundenen Fibrates ist also < 0,12 µM. Nach der Fachinformation für LIPANTHYL® können bei einer Einzeldosis von 300 mg Fenofibrat Plasmaspiegel bis 15 mg/l (entspricht 45 µM) auftreten. Bei einer Plasmaeiweißbindung von ≥ 99% ist demnach mit einer Konzentration von maximal 0,45 µM für das freie, nicht an Albumin gebundene Fenofibrat zu rechnen.

Unter physiologischen Bedingungen werden demzufolge auch bei höherer Dosierung freie Plasmakonzentrationen > 1 µM nicht erreicht. Ähnliches gilt auch für die anderen Fibrate und sicher auch für die untersuchten neu synthetisierten Substanzen. Bei den folgenden Betrachtungen wurden deshalb Effekte, die durch die untersuchten Substanzen bei einer Konzentration von 1 µM im Reaktionsansatz erzielt wurden, besonders hervorgehoben.

Bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion oder vermindertem Plasma-Proteingehalt werden höhere freie Fibrat-Plasmaspiegel erreicht, wenn die Dosis nicht angepaßt wird. Da Patienten, die mit Lipidsenkern behandelt werden, im Rahmen des metabolischen Syndroms oft auch einen langjährigen Diabetes mellitus Typ II mit diabetischer Nephropathie haben, ist die Kombination von Hypertriglyceridämie oder Hypercholesterinämie und Niereninsuffizienz nicht selten (Baggio et al. 2001; Battisti et al. 2003; Wagh und Stone 2004). Wenn eine Substanz in unseren Untersuchungen eines oder mehrere der Isoenzyme des P450 ab einer



Konzentration von 10 µM hemmte, könnte das daher unter pathologischen Bedingungen relevant sein. Ein Effekt, der bei unseren in vitro-Versuchen erst bei Konzentrationen der Fibrat-Derivate von 100 µM eintrat, ist in vivo vermutlich nicht von Bedeutung, da derartige Konzentrationen im Körper nicht erreicht werden. Da die Substanzen oral verabreicht werden, ist jedoch nach Applikation mit einer relativ hohen Konzentration in der V. portae und damit auch in der Leber zu rechnen.

### **7.1. Einfluß der untersuchten Substanzen auf die Monooxygenasefunktion des Cytochrom P450**

Die Erforschung der Wirkung der untersuchten Substanzen auf die Monooxygenasefunktion ist wichtig, da ein Einfluß auf diese Enzyme, wie in der Einleitung dargelegt, Interaktionen mit anderen Pharmaka oder auch mit körpereigenen Stoffen verursachen kann. Auch eine Leberschädigung bei längerer Applikation ist möglich.

Die Kombination von Fibraten und CSE-Hemmern hat durchaus klinische Bedeutung, da diese beiden Substanzklassen unterschiedliche, aber synergistische Wirkungsmechanismen haben. Die Kombination der momentan zugelassenen Präparate wird in Deutschland kritisch beurteilt, da sich die Nebenwirkungen beider Substanzklassen addieren können und so z.B. das Risiko für das Auftreten einer Rhabdomyolyse deutlich steigt (Hodel 2002; Finsterer 2003; Matzno et al. 2003). Im angloamerikanischen Raum werden jedoch CSE-Hemmer und Fibrate häufig gemeinsam eingesetzt. Speziell die gleichzeitige Verabreichung von Gemfibrozil und Cerivastatin führte zu gehäuften Todesfällen als Folge der Rhabdomyolyse und sekundärem Nierenversagen (Hodel 2002; Finsterer 2003; Matzno et al. 2003; Chang et al. 2004). Cerivastatin wurde daraufhin vom Markt genommen. Als Ursache wird ein erhöhter Plasmaspiegel des Cerivastatins angenommen, welcher auf der Hemmung der Metabolisierung dieser Substanz über P450 2C8 und 3A4 durch das Gemfibrozil beruht (Backman et al. 2002; Wang et al. 2002). Cerivastatin wird beim Menschen wie die Fibrate hauptsächlich über P450 3A4 verstoffwechselt und nur zu einem geringen Teil über P450 2C8. Auch Simvastatin, Lovastatin und Atorvastatin werden durch P450 3A4 metabolisiert (Pauli-Magnus und Eichelbaum 1998; Igel et al. 2001). Mögliche Interaktionen vorwiegend am P450 3A sollten daher bei einer Kombinationstherapie von Hyperlipidämien bedacht werden. Da die Biotransformation von Fluvastatin vorwiegend durch das P450 2C9 erfolgt (Pauli-Magnus und Eichelbaum 1998; Igel et al. 2001), wird empfohlen, vorzugsweise Fluvastatin mit einem Fibrat zu kombinieren (UK HDL-C Consensus Group 2004). Diese Kombination wird in den aktuellen Fachinformationen von LIPANTHYL® und LOCOL® auch

als möglich ausgewiesen. Auch Pravastatin und vor allem Rosuvastatin, die keine nennenswerte Metabolisierung über P450 3A4 erfahren (Pauli-Magnus und Eichelbaum 1998; Igel et al. 2001; Davidson 2002; White 2002; Rosenson 2003; Scott et al. 2004), könnten eine günstige Co-Medikation für Fibrate darstellen.

Die Statine ähneln in Ihrer Struktur dem Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA), einer Cholesterinvorstufe, und wirken als kompetitive Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase (Moghadasian et al. 2000; Müller-Wieland und Krone 2003; Schwandt et al. 2004). Fibrate steigern die Oxidation von Fettsäuren in der Leber und im Muskel. Das führt in der Leber zu einer verminderten Sekretion von triglyceridreichen Lipoproteinen. In der Muskulatur wird die Aktivität der Lipoproteinlipase gesteigert und es werden vermehrt Fettsäuren aufgenommen (Nikkilä et al. 1977; Müller-Wieland und Krone 2003; Schwandt et al. 2004). Sie aktivieren den nukleären Transkriptionsfaktor „peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ “, der die Expression der LDL-Cholesterin- und Apolipoprotein-A1-Gene hochreguliert und die des Apolipoprotein-CII-Gens vermindert (Auwerx et al. 1996; Steals et al. 1998; Etgen und Mantlo 2003; Müller-Wieland und Krone 2003; Cornwell et al. 2004; Schwandt et al. 2004). Fibrate haben eine stärkere Wirkung auf den HDL-Spiegel als Statine. Zusätzlich sind sie in der Lage, die Schwebfähigkeit von LDL-Partikeln zu erhöhen, was möglicherweise ein positiver Effekt ist (De Graaf 1993; Müller-Wieland und Krone 2003; Schwandt et al. 2004; UK HDL-C Consensus Group 2004).

Zur Zeit sind sie die wirksamsten Substanzen zur Behandlung einer Hypertriglyceridämie. Über die pathogene Wirkung der Hypertriglyceridämie ist momentan nicht viel bekannt, jedoch scheint sie eine Rolle bei Genese der Pankreatitis zu spielen (Müller-Wieland und Krone 2003; Schwandt et al. 2004). Bei Typ II-Diabetikern mit ausgeprägter Insulinresistenz fallen regelmäßig sehr hohe Triglyceridspiegel auf (Müller-Wieland und Krone 2003; Schwandt et al. 2004). Die Indikationen für Fibrate sind die familiäre Hypertriglyceridämie, die familiäre kombinierte Hyperlipidämie, die familiäre Dysbetalipoproteinämie sowie die familiäre Hypoalphalipoproteinämie (Müller-Wieland und Krone 2003; Schwandt et al. 2004; UK HDL-C Consensus Group 2004).

Die Kombination von Statinen und Fibraten ist v.a. bei Patienten mit niedrigen HDL- und sehr hohen Triglyceridspiegeln sinnvoll. Sollte bei der Therapie der Hypertriglyceridämie auch ein LDL-Anstieg gewünscht sein, wird die Kombination mit einem Statin empfohlen (Müller-Wieland und Krone 2003; Schwandt et al. 2004; Streja 2004; UK HDL-C Consensus Group 2004).

Eine Studie von Charmoillaux et al. aus dem Jahre 1991 belegt, daß bei simultaner Verabreichung von Simvastatin, einem CSE-Hemmer, und Ciprofibrat sich die „Hepatosomatic ratio“ (Verhältnis des Lebergewichtes zum Körpergewicht der Tiere) im Vergleich zur alleinigen Gabe von Ciprofibrat signifikant verringerte. Auch die Induktion mikrosomaler Enzyme war deutlich vermindert. Auf die erhöhte Aktivität der peroxisomalen Enzyme nach Ciprofibrat-Gabe, wie z.B. die Katalase, scheint die zusätzliche Verabreichung von Simvastatin jedoch keinen Effekt zu haben. Eine Kombination der beiden Substanzklassen könnte daher auch aufgrund dieser Befunde eine günstige Pharmakotherapie bei Patienten mit Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie und niedrigem HDL darstellen.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte **Ciprofibrat** keine der durchgeführten Modellreaktionen bei einer Konzentration von  $< 100 \mu\text{M}$  hemmen. Eine Beeinflussung der Familien 1A, 2A, 2B, 2C, 2E, 3A und 4A1 des P450 in vivo ist nicht zu erwarten. Interaktionen mit Substanzen, die durch diese Isoenzyme metabolisiert werden sind unwahrscheinlich. Bei pathologisch hohem Ciprofibrat-Plasmaspiegel ist vor allem mit einer Wechselwirkung mit den Isoenzymen 1A und 2B zu rechnen, da in unseren Untersuchungen bei den für sie charakteristischen Modellreaktionen die stärkste Hemmung auftrat.

Ciprofibrat-Glycinat verhielt sich ähnlich dem Ciprofibrat. In vitro wurden die P450-Familien 1A, 2A, 2B, 2C, 2E, und 3A ebenfalls erst bei Konzentrationen  $\geq 100 \mu\text{M}$  gehemmt. Ein Vorteil des Ciprofibrat-Glycinats gegenüber der „Muttersubstanz“ ist nicht erkennbar.

Ciprofibrat-Glycinat-Methylester wies deutliche Unterschiede zur „Muttersubstanz“ und deren Glycinat auf. Die EROD, ECOD, PROD und ENDM wurden deutlich stärker gehemmt. Die ECOD wurde bereits bei  $1 \mu\text{M}$  signifikant vermindert, die PROD und die ENDM ab  $10 \mu\text{M}$ . Die ECOD charakterisiert vorwiegend die Familien 1A, 2A, 2B und 2C des P450. Die PROD ist nur für das Isoenzym 2B spezifisch (Gibson und Skett 1994; Lewis 1996). In vivo wäre unter physiologischen Bedingungen und bei therapeutischer Dosierung mit einer Interaktion mit mindestens einer der Familien 1A, 2A, 2B, oder 2C des P450 zu rechnen. Mit großer Wahrscheinlichkeit wird aber das P450 2B ab einer Ciprofibrat-Glycinat-Methylester-Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  beeinflusst, da neben der Hemmung der PROD der Einfluß auf die ECOD ebenfalls auf einer Wechselwirkung mit dem Isoenzym 2B beruhen könnte. Eine verminderte oder erhöhte Aktivität des P450 2B könnte die Metabolisierung vieler Pharmaka, wie z.B. von Phenobarbital oder Phenytoin beeinflussen (Gibson und Skett 1994; Lewis 1996). Eine Interaktion mit dem P450 3A ist bei Verabreichung hoher Dosen oder bei Kumulation dieses Fibrat-Derivates zu erwarten.

**Clofibrat** hemmte in unseren Untersuchungen keine der Modellreaktionen bei in vivo relevanten Konzentrationen ( $\leq 10 \mu\text{M}$ ). Bei der ECOD war zwar bei Clofibrat-Konzentrationen von 10 und 100  $\mu\text{M}$  ein signifikanter Effekt zu beobachten, die Hemmung war jedoch sehr schwach ausgeprägt und trat überraschenderweise bei der höchsten Konzentration nicht auf, so daß diese Wirkungen als zufällig und nicht relevant gedeutet werden müssen.

Im Gegensatz zur „Muttersubstanz“ Clofibrat hemmte Clofibrat-Glycinat die ENDM, wenn auch gering, bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ . Bei dieser Substanz ist demnach auch unter physiologischen Bedingungen und bei therapeutischer Dosis mit Wechselwirkungen mit dem P450 3A zu rechnen, was einen Nachteil gegenüber Clofibrat darstellt. P450 3A-Substrate sind z.B. die CSE-Hemmer Lovastatin, Simvastatin und Atorvastatin, aber auch fast alle Kalzium-Kanal-Blocker, wie z.B. Felodipin, Nifedipin, Nitrendipin und Verapamil. Ferner sollten in diesem Zusammenhang noch die Makrolid-Antibiotika, die Benzodiazepine und nicht zuletzt Steroidhormone erwähnt werden (Gibson und Skett 1994; Lewis 1996; Gibson et al. 2002). Andererseits sind auch viele als Arzneimittel zugelassene Substanzen Hemmer des P450 3A, wie z.B. Verapamil, Erythromycin, Cimetidin und Ketoconazol (Gibson und Skett 1994; Lewis 1996; Gibson et al. 2002). Da Clofibrat-Glycinat die anderen Modellreaktionen fast nicht beeinflusste, ist eine Wechselwirkung mit den P450-Familien 1A, 2A, 2B, 2C, 2E und 4A nicht zu erwarten. Da sich Clofibrat-Glycinat diesbezüglich ähnlich der „Muttersubstanz“ verhält, ergeben sich daraus aber keine Vorteile.

Clofibrat-Glycinat-Methylester beeinflusste ähnlich wie Clofibrat die Modellreaktionen erst bei sehr hohen Konzentrationen ( $> 100 \mu\text{M}$ ). Es ergeben sich daraus jedoch ebenfalls kaum Vorteile zur „Muttersubstanz“.

**Bezafibrat** verminderte die p-NPH ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Es könnte daher bei einer Kumulation der Substanz zu einer Wechselwirkung mit dem P450 2E1 kommen. Die anderen Modellreaktionen wurden, falls überhaupt, durch Bezafibrat nur bei höheren Konzentrationen ( $\geq 100 \mu\text{M}$ ) beeinflusst.

Bei der Substanz Bezafibrat-Glycinat war die Hemmung der p-NPH deutlich schwächer als bei Bezafibrat. Im Gegensatz zur „Muttersubstanz“ und deren Glycinat-Methylester war stattdessen eine stärkere Hemmung der ENDM zu beobachten. Sie war ab einer Bezafibrat-Glycinat-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  signifikant. Da das P450 3A beim Menschen den größten Teil des P450 darstellt und eine wichtige Rolle bei der Biotransformation hat (Gibson und Skett 1994; Lewis 1996; Gibson et al. 2002), könnte der Einfluß auf die ENDM jedoch durchaus von Bedeutung sein.

Die prozentualen Hemmeffekte von Bezafibrat-Glycinat-Methylester auf die EROD, ECOD und PROD waren zwar deutlicher als bei der „Muttersubstanz“ Bezafibrat, traten jedoch nur bei Konzentrationen ab 100  $\mu\text{M}$  auf, die in vivo nicht von Relevanz sind. Im Gegensatz zur „Muttersubstanz“ und deren Glycinat bewirkte bereits eine Konzentration der Substanz von 10  $\mu\text{M}$  eine Hemmung der 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Bildung. Daß Bezafibrat-Glycinat-Methylester eine Interaktion mit dem P450 4A1 verursacht, ist demnach wahrscheinlicher als bei Bezafibrat oder Bezafibrat-Glycinat.

**Fenofibrat** hemmte die Modellreaktionen EROD, ECOD und ENDM sowie die 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Bildung bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Eine Interaktion mit den Familien 1A, 2A, 2B, 2C, 3A oder 4A des P450 ist demnach möglich, wenn die Substanz im Körper kumuliert oder z.B. ein Albuminmangel besteht. Die Ergebnisse der EROD zeigen, daß das P450 1A durch Fenofibrat bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  signifikant beeinflusst wird. Die Hemmung der ECOD könnte ebenfalls auf der Interaktion mit dem P450 1A beruhen, so daß ein Einfluß auf die P450-Familien 2A, 2B und 2C mit den durchgeführten Modellreaktionen nicht zu beweisen ist. Von einer Wirkung auf die P450-Familien 1A, 3A und auch 4A bei einer Fibrat-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ist jedoch auszugehen.

Im Vergleich zur „Muttersubstanz“ hemmte Fenofibrat-Glycinat lediglich die EROD ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Alle anderen Modellreaktion wurden nur in der höchsten Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  beeinflusst. In vivo ist daher bei Kumulation der Substanz nur mit einer Interaktion mit P450 1A zu rechnen, was ein Vorteil gegenüber Fenofibrat ist.

Fenofibrat-Glycinat-Methylester war die einzige Substanz, die bei der Untersuchung der Wirkung auf die Monooxygenasefunktion des P450 drei Modellreaktionen, ECOD, PROD und ENDM, bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  hemmte. Derartige Konzentrationen könnten auch unter physiologischen Bedingungen und bei therapeutischer Dosierung, zumindest als Spitzenkonzentration im Plasma oder in der V. portae nach oraler Einnahme auftreten. Eine Interaktion mit den P450-Familien 1A, 2A, 2B, 2C und 3A ist demzufolge wahrscheinlich, wobei unter physiologischen Bedingungen nur die Wechselwirkung mit dem P450 2B und dem P450 3A als sicher angenommen werden kann (PROD, ENDM). Die Beeinflussung der ECOD könnte alleine auf einer Wirkung auf das P450 2B beruhen. Da jedoch auch noch die EROD ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  deutlich gehemmt wurde, ist zumindest bei Kumulation der Substanz auch mit einer Interaktion mit dem P450 1A zu rechnen. Insgesamt weist Fenofibrat-Glycinat-Methylester hinsichtlich der möglichen Wechselwirkungen mit dem P450-System gegenüber der „Muttersubstanz“ einen deutlichen Nachteil auf.

**Gemfibrozil** hemmte die PROD ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Eine Interaktion mit dem P450 2B wäre also möglich, wenn die Substanz kumuliert. Alle anderen Modellreaktionen wurden nicht bzw. erst ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  beeinflusst.

Im Gegensatz zu Gemfibrozil führte das Glycinat zu einer Hemmung der PROD erst bei einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$ , jedoch kam es bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Verminderung der ENDM. Aufgrund der besonderen Bedeutung des P450 3A wären zahlreiche Interaktionen mit Pharmaka denkbar. Es sei jedoch auch hier noch einmal erwähnt, daß der Plasmaspiegel unter physiologischen Bedingungen um mindestens eine Zehnerpotenz unter 10  $\mu\text{M}$  liegt. Alle anderen Modellreaktionen wurden nicht bzw. in in vivo nicht relevanten Konzentrationen beeinflusst.

Gemfibrozil-Glycinat-Methylester wies gegenüber der „Muttersubstanz“ und deren Glycinat in Bezug auf die Interaktionsmöglichkeiten mit dem P450 deutliche Nachteile auf: So wurden die Modellreaktionen ECOD, p-NPH und ENDM sowie die 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Bildung bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  gehemmt. Bei entsprechendem Plasmaspiegel ist demnach mit einer Beeinflussung der P450-Familien 1A, 2A, 2B, 2C, 2E, 3A und 4A zu rechnen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß durch die Kopplung der „Muttersubstanzen“ mit Glycinat bzw. Glycinat-Methylester keine wesentlichen Vorteile erzielt werden können.

Die Substanz Fenofibrat-Glycinat-Methylester zeigte insgesamt die ungünstigsten Eigenschaften. Bei therapeutischer Dosierung und unter physiologischen Bedingungen ist bei Substanzen, die durch P450 1A, 2A, 2B und 2C bzw. 3A metabolisiert werden mit Interaktionen zu rechnen. Beispiele hierfür wären Coffein, Theophyllin, Clozapin (P450 1A), Phenytoin (P450 2C9), Diazepam, Citalopram, Moclobemid (P450 2C19), Erythromycin, Midazolam, Diltiazem, Verapamil, Nifedipin, Cyclosporin und Tacrolimus (P450 3A4) (Gibson und Skett 1994; Lewis 1996; Gibson et al. 2002).

Fibrate induzieren in vivo das P450 4A1 (Knopp et al. 1999). Besonders gut untersucht wurde diese Eigenschaft bei Clofibrat und Ciprofibrat (Makowska et al. 1991). Eine stärkere Hemmung der Laurinsäure-Hydroxylierung in vitro konnte jedoch bei keiner der untersuchten Substanzen beobachtet werden.

Abschließend sei bemerkt, daß die Glycinat- bzw. Glycinat-Methylester-Verbindungen wahrscheinlich Prodrugs sind und das Glycinat bzw. der Glycinat-Methylester von den „Muttersubstanzen“ in vivo abgespalten wird. Die Unterschiede zu den „Muttersubstanzen“,

die bei unseren Untersuchungen festgestellt wurden, sind deshalb evtl. nur in vitro nachweisbar. Durch die Kopplung der Fibrate mit Glycin bzw. Glycinat-Methylester müssen weitere Bindungen gespalten werden, um die eigentlich wirksame Substanz freizusetzen. Die Halbwertszeit könnte sich dadurch verlängern. Das hat den Vorteil, daß die Substanzen in größeren Abständen verabreicht werden können, was großen Einfluß auf die Compliance der Patienten hat. Um die Pharmakokinetik der neu synthetisierten Substanzen beurteilen zu können sind jedoch in vivo-Versuche erforderlich.

## 7.2. Mögliche prooxidative/antioxidative Eigenschaften der untersuchten Substanzen

Um den Einfluß der Fibrat-Derivate auf die Oxidasefunktion des P450 zu untersuchen, wurden die Modellreaktionen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung, NADPH/ $\text{Fe}^{2+}$ -stimulierte Lipidperoxidation sowie die Luminol- und Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz in Lebermikrosomen durchgeführt. Zur Erfassung möglicher „echter“ Scavenger-Eigenschaften der Substanzen wurde weiterhin die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz im Rattenvollblut gemessen.

**Ciprofibrat** hemmte die Modellreaktionen erst ab Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$ . Dieser Effekt ist in vivo nicht relevant.

Ciprofibrat-Glycinat dagegen verminderte die durch die Modellreaktionen LMCL und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung gemessenen Radikale ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  und  $\text{OH}^{\bullet}$ ) bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Dieser Effekt könnte in vivo von Bedeutung sein, wenn die Substanz im Körper kumuliert.

Ciprofibrat-Glycinat-Methylester bewirkte ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine Reduktion der gemessenen Radikale bei den Modellreaktionen LMCL und LCCL. Auch dieser Effekt ist nur zu erwarten, wenn die Substanz im Körper kumuliert.

Die Hemmwirkung auf die  $\text{Fe}^{2+}$ /NADPH-stimulierten Lipidperoxidation läßt auf eine verminderte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch **Clofibrat** schließen. Dieser Effekt trat ab einer Clofibrat-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf und ist deshalb in vivo auch erst unter pathologischen Bedingungen, die zu erhöhten Clofibrat-Konzentrationen im Körper führen, zu erwarten. Alle anderen Modellreaktionen wurden durch Clofibrat erst bei Konzentrationen beeinflusst, die in vivo nicht erreicht werden.

Clofibrat-Glycinat konnte die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung in Lebermikrosomen bereits signifikant verringern wenn es in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  vorlag. Diese Eigenschaft hatte weder die „Muttersubstanz“ Clofibrat noch deren Glycinat-Methylester-Verbindung. Auch die Wirkung auf die LMCL war bei dieser Substanz am stärksten. Ab einer Konzentration von

10  $\mu\text{M}$  wurde eine signifikante Verringerung der gemessenen Lichtimpulse beobachtet. Es ist demnach mit einer Verminderung der durch das P450 freigesetzten Radikale bei in vivo relevanten Konzentrationen zu rechnen, was einen Vorteil gegenüber der „Muttersubstanz“ und deren Glycinat-Methylester-Verbindung darstellt.

Im Gegensatz zu Clofibrat und dessen Glycinat hatte die Substanz Clofibrat-Glycinat-Methylester keinen Effekt auf die LPO. Auch die anderen Modellreaktionen wurden erst bei hohen Konzentrationen, die in vivo nicht von Bedeutung sind, beeinflusst. Eine relevante Verminderung der durch das P450 gebildeten Radikale ist nicht zu erwarten. Die Substanz scheint diesbezüglich keine Vorteile gegenüber der „Muttersubstanz“ und deren Glycinat zu haben.

**Bezafibrat** konnte bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung in Lebermikrosomen signifikant vermindern, es handelt sich also auch hier um einen Effekt, der in vivo erst bei Kumulation der Substanz relevant ist.

Auch Bezafibrat-Glycinat reduzierte die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung in Lebermikrosomen ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Ebenso wurden die bei der LMCL gemessenen Radikale, im Gegensatz zur „Muttersubstanz“, bereits ab dieser Konzentration signifikant verringert. Ein in vivo relevanter Effekt ist jedoch nicht zu erwarten. Bei den anderen Modellreaktionen verhielt sich Bezafibrat-Glycinat wie die „Muttersubstanz“ und hatte nur einen geringen bzw. keinen Einfluß.

Bezafibrat-Glycinat-Methylester beeinflusste die durchgeführten Modellreaktionen entweder nicht oder erst bei Konzentrationen, die in vivo nicht auftreten ( $\geq 100 \mu\text{M}$ ).

**Fenofibrat** verursachte lediglich bei einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  eine Hemmung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung. Alle anderen Modellreaktionen wurden nicht beeinflusst. Die Substanz kann somit insgesamt in vivo weder die Radikalbildung beeinflussen, noch Radikale neutralisieren. Bei Fenofibrat-Glycinat kam es ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Verringerung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung in Lebermikrosomen. Ein Effekt auf die anderen Modellreaktion zeigte sich erst bei höheren Konzentrationen.

Die Glycinat-Methylester-Verbindung des Fenofibrates konnte bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  die Bildung der durch die LCCL gemessenen Radikale vermindern, auf die anderen Modellreaktionen hatte diese Substanz keinen Einfluß oder zeigte erst bei Konzentrationen ab 100  $\mu\text{M}$  eine Hemmwirkung. Insgesamt ergab sich bei beiden Derivaten des Fenofibrats ein geringgradiger Vorteil gegenüber der Muttersubstanz.

**Gemfibrozil** war neben Clofibrat-Glycinat die einzige der untersuchten Substanzen, die eine der durchgeführten Modellreaktionen (in diesem Fall die LMCL) bereits bei einer



Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  hemmte. Dieser Effekt könnte unter physiologischen Bedingungen bei therapeutischer Dosierung wirksam sein. Mit der LMCL lassen sich, wie bereits beschrieben,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^{\bullet}$  besonders gut nachweisen. Da die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung in Lebermikrosomen durch Gemfibrozil gesteigert wurde (ab 100  $\mu\text{M}$ ), ist anzunehmen, daß diese Substanz die Bildung von  $\text{O}_2^{\bullet}$  vermindert. Die gesteigerte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung in Lebermikrosomen könnte durch eine Entkopplung des oxidativen Zyklus des P450 verursacht sein.

Gemfibrozil-Glycinat bewirkte im Gegensatz zur „Muttersubstanz“ bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine signifikante Hemmung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung und der LPO. Daß auch die LMCL ab dieser Konzentration signifikant beeinflusst wurde, könnte ebenfalls an der verminderten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung liegen. Die Effekte gewinnen in vivo jedoch erst bei Kumulation der Substanz an Bedeutung.

Gemfibrozil-Glycinat-Methylester verursachte bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine Erhöhung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung in Lebermikrosomen. Auch diese Substanz verminderte die Radikalbildung bei allen anderen Modellreaktionen, so daß eine Entkopplung des oxidativen Zyklus des P450 unwahrscheinlich ist. Im Gegensatz zu Gemfibrozil hatte dessen Glycinat-Methylester-Verbindung keinen Einfluß auf die LMCL. Bei den Modellreaktionen LCCL und LPO war die Verminderung der Radikalbildung durch Gemfibrozil-Glycinat-Methylester ausgeprägter als durch Gemfibrozil. Da alle beschriebenen Effekte erst bei Konzentrationen auftraten, die in vivo eine Kumulation des Pharmakons voraussetzen, sind sie nicht als positiver Nebeneffekt bei einer möglichen Pharmakotherapie zu werten.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß nur Clofibrat-Glycinat und Gemfibrozil unter physiologischen Bedingungen und bei therapeutischer Dosierung in der Lage sind, die Bildung von Radikalen zu vermindern. Da die Chemilumineszenz im Rattenvollblut durch Clofibrat-Glycinat lediglich bei einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  und durch Gemfibrozil ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  beeinflusst wurde, ist davon auszugehen, daß dieser Effekt auf einer Interaktion mit der Oxidase-Funktion des P450 beruht. „Echte“ Scavenger-Eigenschaften sind unwahrscheinlich.

Keine der untersuchten Substanzen ist in der Lage bei Konzentrationen, die in vivo relevant sind, den oxidativen Zyklus des P450 zu entkoppeln.

Alle Substanzen außer Ciprofibrat, Clofibrat-Glycinat-Methylester, Bezafibrat-Glycinat-Methylester und Fenofibrat hemmten mindestens eine der Modellreaktionen, wenn sie in einer Konzentration  $\geq 10 \mu\text{M}$  vorlagen. Sie sind bei derartigen Konzentrationen also in der Lage,

die Bildung von Radikalen zu vermindern. Eine Konzentration  $\geq 10 \mu\text{M}$  wird aber unter physiologischen Bedingungen bei therapeutischer Dosierung im Plasma nicht erreicht. Auch hier gilt, was schon bei den Modellreaktionen für die Monooxygenasefunktion erwähnt wurde. In bestimmten Kompartimenten (z.B. in der Leber), durch einen verminderten Albumingehalt des Plasmas (z.B. beim nephrotischen Syndrom) oder durch andere pathologische Zustände könnten solche erhöhten Konzentrationen auftreten. Wenn die untersuchten Substanzen nur unter pathologischen Bedingungen, die zu einer Zunahme ihrer Konzentration um mindestens das 10-fache führen, in der Lage sind, die Radikalbildung zu vermindern, so hat das als positive „Nebenwirkung“ für die Pharmakotherapie keine praktische Bedeutung. Eine verminderte Radikalbildung als günstiger Nebeneffekt der medikamentösen Therapie einer Hypertriglyceridämie oder Hypercholesterinämie ist nur bei Clofibrat-Glycinat und Gemfibrozil zu erwarten.

Wie bereits erwähnt, wurde noch eine weitere Modellreaktion durchgeführt, die helfen soll, „echte“ Scavenger-Eigenschaften einer Substanz zu verifizieren, die Messung der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz im Rattenvollblut. Außer Bezafibrat und Fenofibrat-Glycinat, die signifikante Effekte bereits ab  $10 \mu\text{M}$  zeigten, hemmten alle anderen untersuchten Fibrate die Chemilumineszenz im Rattenvollblut erst bei hohen Konzentrationen. Sie scheinen demnach keine therapeutisch relevanten „echten“ Scavenger-Eigenschaften zu haben.

## 8. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Keines der neu synthetisierten Fibrate zeigte therapeutisch relevante Vorteile gegenüber seiner „Muttersubstanz“ hinsichtlich einer Interaktion mit der Monooxygenasefunktion des P450. Fenofibrat-Glycinat-Methylester wies hinsichtlich seines Wechselwirkungspotentials mit dem P450-System insgesamt die ungünstigsten Eigenschaften auf. Bei den Substanzen Clofibrat-Glycinat und Fenofibrat-Glycinat-Methylester und evtl. auch bei Ciprofibrat-Glycinat-Methylester ist bei therapeutischer Dosierung mit Wechselwirkungen mit den untersuchten Monooxygenasen des P450 zu rechnen. Am günstigsten waren die Ergebnisse mit Ciprofibrat, Clofibrat und Clofibrat-Glycinat-Methylester. Bei diesen Substanzen ist in vivo offensichtlich nicht mit einer Interaktion mit einer der untersuchten Familien des P450 (1A, 2A, 2B, 2C, 2E, 3A, 4A) zu rechnen. Alle anderen Fibrat-Derivate könnten mindestens eins der untersuchten Isoenzyme des P450 beeinflussen, falls sie im Körper kumulieren. Insgesamt sind bei den Substanzen Ciprofibrat, Clofibrat und Clofibrat-Glycinat-Methylester, wenn sie z.B. mit einem durch das P450 3A metabolisierten CSE-Hemmer (Simvastatin, Lovastatin, Atorvastatin und Cerivastatin) kombiniert verabreicht werden, die wenigsten Interaktionen und damit Nebenwirkungen wie eine Rhabdomyolyse zu erwarten.

Nur Clofibrat-Glycinat und Gemfibrozil könnten bei therapeutischer Dosierung die Bildung von Radikalen vermindern. Keine der untersuchten Substanzen wies deutliche „echte“ Scavenger-Eigenschaften auf. Umgekehrt war auch keines der Fibrate oder Fibrat-Derivate in der Lage, in in vivo relevanten Konzentrationen den oxidativen Zyklus des P450 zu entkoppeln und somit prooxidativ zu wirken.

Insgesamt ließ sich in der vorliegenden Untersuchung bezüglich einer Interaktion mit der Monooxygenase- bzw. der Oxidasefunktion des P450 keine relevante Verbesserung (aber auch keine Verschlechterung) der pharmakologischen Eigenschaften der Fibrate durch eine Kopplung mit Glycin oder Glycinat-Methylester feststellen. Ob eine Weiterentwicklung dieser Derivate für die Klinik sinnvoll ist, hängt nicht zuletzt auch von den pharmakodynamischen Wirkungen dieser Substanzen im Vergleich zu den Ausgangsverbindungen ab, was zunächst in einem geeigneten Tiermodell überprüft werden mußte.

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

Adkins JC, Faulds D. 1997. Micronised fenofibrate: a review of its pharmacodynamic properties and clinical efficacy in the management of dyslipidaemia. *Drugs* 54: 615-633.

Aitio A. 1978. A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation. *Anal Biochem* 85: 488-491.

Allen RC. 1986. Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. *Methods Enzymol* 133: 449-493.

Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC, Steals B. 1996. Transcriptional control of triglyceride metabolism: fibrates and fatty acids change the expression of the LPL and C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR. *Atherosclerosis* 124: 29-39.

Backman JT, Kyrklund C, Neuvonen M, Neuvonen PJ. 2002. Gemfibrozil greatly increases plasma concentrations of cerivastatin. *Clin Pharmacol Ther* 72: 685-691.

Baggio B, Budakovic A, Casara D, Gambaro G, Saladini G, Piccoli A, Verlato F. 2001. Renal involvement in subjects with peripheral atherosclerosis. *J Nephrol* 14: 286-292.

Balfour JA, McTavish D, Heel RC. 1990. Fenofibrate: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in dyslipidaemia. *Drugs* 40: 260-290.

Battisti WP, Palmisano J, Keane WE. 2003. Dyslipidemia in patients with type 2 diabetes: relationships between lipids, kidney disease and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med* 41: 1174-1181.

Bays HE, Dujovne CA. 1998. Drug interactions of lipid-altering drugs. *Drug Safety* 19: 355-371.

Behrend L, Henderson G, Zwacka RM. 2003. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Transact* 31: 1441-1444.

Betteridge DJ. 1993. Ciprofibrate – a profile. *Postgrad Med J* 69: S42-47.

Biesalski HK, Frank J. 1995. Antioxidants in nutrition and their importance in the anti-/oxidative balance in the immune system. *Immunität und Infektion* 23: 166-173.

Biesalski HK. 2002. Free radical theory of aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5: 5-10.

Brodie B, Axelrod J, Cooper JR, Gaudette L, Ladu BN, Mitoma C, Udenfried S. 1955. Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science* 121: 603-615.

Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52: 302-310.

Chang TH, Crespi CH, Waxman DJ. 1997. Spectrophotometric analysis of human CYP2E1-catalyzed p-nitrophenol hydroxylation. *Meth Mol Biol* 107: 147-152.

Chang JT, Staffa JA, Parks M, Green L. 2004. Rhabdomyolysis with HMG-CoA reductase inhibitors and gemfibrozil combination therapy. *Pharmacoepidemiol Drug Safety* 13: 417-426.

Chapman MJ. 2003. Fibrates in 2003: therapeutic action in atherogenic dyslipidaemia and future perspectives. *Atherosclerosis* 171: 1-13.

Charmoillaux M, Goudonnet H, Mercenne J, Truchot J, Truchot R. 1991. Comparative and simultaneous effects of simvastatin and ciprofibrate on plasma lipid parameters and upon hepatic drug metabolizing and peroxisome proliferation marker enzymes in ten male wistar rats. *Cell Mol Biol* 37: 765-771.

Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Hrsg. 1994. *Innere Medizin*. 3. Auflage. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg-Verlag.

Cornwell PD, De Souza AT, Ulrich RG. 2004. Profiling of hepatic gene expression in rats treated with fibric acid analogs. *Mutat Res* 549: 131-145.

Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. 2001. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 53: 135-159.

Czejka MJ. 1991. Ciprofibrate: erythrocyte partition coefficient and binding to serum protein. *Arch Pharm (Weinheim, Germany)* 324: 860-863.

Dargel R. 1992. Lipid peroxidation – a common pathogenetic mechanism? *Exp Toxic Pathol* 44: 455-468.

Davidson MH. 2002. Rosuvastatin: a highly efficacious statin for the treatment of dyslipidemia. *Exp Opin Investig Drugs* 11: 125-141.

- De Graaf J, Hendriks JC, Demacker PN, Stahlenhoef AF. 1993. Identification of multiple dense LDL subfractions with enhanced susceptibility to in vitro oxidation among hypertriglyceridemic subjects: normalisation after clofibrate treatment. *Arterioskler Thromb* 13: 712-719.
- Degtyarenko KM, Fábíán P. 2004. Directory of P450 containing systems. <http://www.icgeb.trieste.it/p450/>.
- Ding X, Kaminsky LS. 2003. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 43: 149-173.
- Dirven HAAM, de Bruijn AAGM, Sessink PJM, Jongeneelen FJ. 1991. Determination of the cytochrome P-450 IV marker,  $\omega$ -hydroxylauric acid, by high-performance liquid chromatography and fluorimetric detection. *J Chromatogr* 564: 266-271.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
- Du L, Hoffman SM, Keeney DS. 2004. Epidermal CYP2 family cytochromes P450. *Toxicol Appl Pharmacol* 195: 278-287.
- Duclos A, Bride J, Ramirez LC, Bournot P. 1997. Peroxisome proliferation and  $\beta$ -oxidation with Fao and MH<sub>1</sub>C<sub>1</sub> rat hepatoma cells, HepG2 human hepatoblastoma cells and cultured human hepatocytes: effect of ciprofibrate. *Europ J Cell Biol* 72: 313-323.
- Esterbauer H, Zollner H. 1989. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med* 7: 197-203.
- Etgen GJ, Mantlo N. 2003. PPAR ligands for metabolic disorders. *Curr Topics Med Chem* 3: 1649-1661.
- Faulkner K, Fridovich I. 1993. Luminol and lucigenin as detectors for O<sub>2</sub><sup>•</sup>. *Free Radic Biol Med* 15: 447-451.
- Feller D, Singh Y, Shirhatti V, Kocarek TA. 1987. Characterization of ciprofibrate and clofibric acid as peroxisomal proliferators in primary cultures of rat hepatocytes. *Hepatol* 7: 508-516.

Ferry N, Bernard N, Pozet N, Gardes E, Cuisinaud G, Labeeuw M, Zech PY, Sassard J. 1989. The influence of renal insufficiency and hemodialysis on the kinetics of ciprofibrate. *Br J Clin Pharmacol* 28: 675-681.

Finsterer J. 2003. Fibrate and statine myopathy. *Nervenarzt* 74: 115-122.

Frick MH, Elo O, Haapa K. 1987. Helsinki Heart Study: primary prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidaemia: safety in treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 317: 1237-1245.

Gibson GG, Skett P, Hrsg. 1994. Pathways of drug metabolism: Enzymology and molecular mechanism of drug metabolism reactions. In: *Introduction to drug metabolism*. London: Chapman & Hall, 1-76.

Gibson GG, Plant NJ, Swales KE, Ayrton A, El Sankary W. 2002. Topics in xenobiochemistry: receptor-dependent transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man. *Xenobiotica* 32: 165-206.

Goeptar AR, Scheerens H, Vermeulen NP. 1995. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* 25: 25-65.

Goldstein BD, Witz G. 1990. Free radicals and carcinogenesis. *Free Radical Res Commun* 11: 3-10.

Gordon D, Rifkind BM. 1989. Current concepts: high density lipoproteins – the clinical implications of recent studies. *New Engl J Med* 321: 1311-1315.

Graham MJ, Wilson SA, Winham MA, Spencer AJ, Rees JA, Old SL, Bonner FW. 1994. Lack of peroxisome proliferation in marmoset liver following treatment with ciprofibrate for three years. *Fundam Appl Toxicol* 22: 58-64.

Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54: 469-487.

Halliwell B, Gutteridge JM. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85.

Hedlund E, Gustafsson JA, Warner M. 2001. Cytochrome P450 in the brain: a review. *Curr Drug Metabol* 2: 245-263.

Herold G. 2002. *Innere Medizin*. Köln: Verlag Arzt und Information.

Hess R, Staubli W, Riess W. 1965. Nature of hepatomegaly: effect produced by ethyl-chlorophenoxy-isobutyrate in the rat. *Nature* 208: 856-858.

Hietanen V. 1980. Role of hepatic metabolism. In: Testa B, Jenner P, Hrsg. *Concepts of drug metabolism*. New York, Basel: Dekker, 251-284.

Hildebrandt AG, Roots I, Tjoe M, Heinemeyer G. 1978. Hydrogen peroxide in hepatic microsomes. *Methods Enzymol* 52: 342-350.

Hodel C. 2002. Myopathy and rhabdomyolysis with lipid-lowering drugs. *Toxicol Lett* 128: 159-168.

Hogg N. 1998. Free radicals in disease. *Semin Reprod Endocrinol* 16: 241-248.

Hurst JK, Barrette WC. 1989. Leukocytic oxygen activation and microbicidal oxidative toxins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 24: 271-328.

Igel M, Sudhop T, von Bergmann K. 2001. Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A-reductase inhibitors (statins). *Eur J Clin Pharmacol* 57: 357-364.

Ignatowicz E, Rybczynska M. 1994. Some biochemical and pharmacological aspects of free radical-mediated tissue damage. *Pol J Pharmacol* 46: 103-114.

Kaminsky LS, Fasco MJ. 1992. Small intestinal cytochromes P450. *Crit Rev Toxicol* 21: 407-422.

Kehrer JP. 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23: 21-48.

Kleeberg U, Klinger W. 1982. Sensitive formaldehyde determination with Nash's reagent and a 'tryptophan reaction'. *J Pharmacol Meth* 1: 19-32.

Klinger W, Müller D. 1974. The influence of age on the protein concentration in serum, liver and kidney of rats determined by various methods. *Z Versuchstierkd* 16: 2677-2685.



Klinger W, Müller D. 1977. Ethylmorphine N-demethylation by liver homogenate of newborn and adult rats; Enzyme kinetics and age course of Vmax and Km. *Acta Biol Med Ger* 36: 1149-1159.

Klinger W, Karge E, Kretzschmar M, Rost M, Schulze HP, Dargel R, Reinemann C, Rein H. 1996. Luminol- and lucigenin-amplified chemiluminescence with rat liver microsomes. Kinetics and influence of ascorbic acid, glutathione, dimethylsulfoxide, N-t-butyl-a-phenyl-nitron, copper-ions and a copper complex, catalase, superoxide dismutase, hexobarbital and aniline. *Exp Toxic Pathol* 48: 447-460.

Knopp RH, Walden CE, Warnick GR, Albers JJ, Ginsberg J, Mc Ginnis BM. 1998. Effect of fenofibrate treatment on plasma lipoprotein lipid, high density lipoprotein cholesterol subfractions and apolipoproteins B, AI, AII and E. *Am J Med* 104: 75-84.

Knopp RH, Alastair JJ, Wood MD. 1999. Arzneimitteltherapie: Medikamentöse Behandlung von Fettstoffwechselstörungen. *New Engl J Med* 341: 498-512.

Kocarek TA, Reddy AB. 1996. Regulation of cytochrome P450 expression by inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase in primary cultured rat hepatocytes and in rat liver. *Drug Metab Dispos* 24: 1197-1204.

Lake BG, Evans JG, Gray TJB, Körösi SA, North CJ. 1989. Comparative studies on nafenopin-induced hepatic peroxisome proliferation in the rat, guinea pig and marmoset. *Toxicol Appl Pharmacol* 99: 148-160.

Lake BG, Rumsby PC, Price RJ, Cunningham ME. 2000. Species differences in hepatic peroxisome proliferation, cell replication and transforming growth factor- $\beta$ 1 gene expression in the rat, Syrian hamster and guinea pig. *Mutat Res* 448: 213-225.

Lewis DFV. 1996. Cytochromes P450: structure, function and mechanism. London, Bristol: Taylor and Francis.

Liu Z, Mortimer O, Smith CA, Wolf CR, Rane A. 1995. Evidence for a role of cytochrome P450 2D6 and 3A4 in ethylmorphine metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 39: 77-80.

Lozada A, Dujovne CA. 1994. Drug interactions with fibric acids. *Pharmacol Ther* 63: 163-176.

- Lubet RA, Mayer RT, Cameron JW, Nims RW, Barke MD, Wolff T. 1985. Deacylation of pentoxyresorufin: a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochromes P450 by phenobarbital and other xenobiotics in rat. *Arch Biochem Biophys* 238: 43-48.
- Makowska JM, Bonner FW, Gibson GG. 1991. Comparative induction of cytochrome P 450 IV A1 and peroxisome proliferation by ciprofibrate in the rat and marmoset. *Arch Toxicol* 65: 106-113.
- Makowska JM, Bonner FW, Gibson GG. 1992. Species differences in ciprofibrate induction of hepatic cytochrome P450 4A1 and peroxisome proliferation. *J Biochem Toxicol* 7: 183-191.
- Marquardt H, Schäfer SG. 1997. *Lehrbuch der Toxikologie*. 2. Auflage. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 69-71.
- Matsubara T, Koike M, Touchi A, Tochino Y, Sugeno K. 1976. Quantitative determination of cytochrome P450 in rat liver homogenate. *Anal Biochem* 75: 596-603.
- Matzno S, Tazuya-Murayama K, Tanaka H, Yasuda S, Mishima M, Uchida T, Nakabayashi T, Matsuyama K. 2003. Evaluation of the synergistic adverse effects of concomitant therapy with statins and fibrates on rhabdomyolysis. *J Pharm Pharmacol* 55: 795-802.
- Miller DB, Spence JD. 1998. Clinical pharmacokinetics of fibric acid derivatives (fibrates). *Clin Pharmacokinet* 34: 155-162.
- Moghadasian MH, Mancini GB, Fröhlich JJ. 2000. Pharmacotherapy of hypercholesterolaemia: statins in clinical practice. *Exp Opin Pharmacother* 1: 683-695.
- Monk JP, Todd PA. 1987. Bezafibrate: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hyperlipidaemia. *Drugs* 33: 539-576.
- Müller D. 1976. Der Einfluß des Lebensalters und des Induktors Phenobarbital auf die Cytochrom P450-abhängige Monooxygenierung von Arzneimitteln in der Rattenleber [Dissertation B]. Jena: Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität.
- Müller-Peddinghaus R, Wurl M. 1987. The amplified chemiluminescence test to characterize antirheumatic drugs as oxygen radical scavengers. *Biochem Pharmacol* 36: 1125-1132.

Müller-Wieland D, Krone W. 2003. Prinzipien zur Therapie von Fettstoffwechselstörungen in der klinischen Praxis. *Medizinische Klinik* 98: 739-743.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M, Hrsg. 2001. *Arzneimittelwirkungen*. 8. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 21-37.

Nash T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem J* 55: 416-421.

Nelson DR, Kamataki T, Waxmann DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O. 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenet* 6: 1-42.

Nikkilä EA, Huttunen JK, Ehnholm C. 1977. Effect of clofibrate on postheparin plasma triglyceride lipase activities in patients with hypertriglyceridemia. *Metabolism* 26: 179-186.

Oelschläger H, Müller D, Hellwich KH, Ueberall S, Seeling A, Machts H, Hofmann B, Glöckner R. 2003. Conjugation reactions of ciprofibrate with human and laboratory animals. *Drug Res / Arzneim-Forsch* 53: 247-253.

Oesch F. 1997. Fremdstoffmetabolismus. In: Marquardt H, Schäfer SG, Hrsg. *Lehrbuch der Toxikologie*. 2. Auflage. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 68-93.

Okada F. 2003. Inflammation and free radicals in tumor development and progression. *Redox Report* 7: 357-368.

Pasanen M, Pelkonen O. 1989. Human placental xenobiotic and steroid biotransformations catalyzed by cytochrome P450. *Drug Metab Rev* 21: 427-461.

Pauli-Magnus CHR, Eichelbaum M. 1998. Arzneimittelinteraktionen bei der Therapie mit CSE-Hemmern. *Arzneimittelther* 11: 343-350.

Pohl RJ, Fouts JR. 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal Biochem* 107: 150-155.

Proteggente AR, Sekher-Püannala A, Paganga G, van Buren L, Evans CA. 2002. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radic Res* 36: 217-233.

Reddy JK, Arzarnow DL, Hignite CE. 1980. Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens. *Nature* 283: 397-398.

Reddy JK, Lalwani ND. 1983. Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. *Crit Rev Toxicol* 12: 1-58.

Reddy JK, Lalwani ND, Qureshi SA, Reddy MK, Moehle CM. 1984. Induction of hepatic peroxisome proliferation in non-rodent species, including primates. *Am J Pathol* 114: 171-183.

Rodriguez C, Noe V, Cabrero A, Ciudad CJ, Laguna JC. 2000. Differences in the formation of PPARalpha-RXR/alphaPPRE complexes between responsive and non-responsive species upon fibrate administration. *Mol Pharmacol* 58: 185-193.

Rosenson RS. 2003. Rosuvastatin: a new inhibitor of HMG-CoA reductase for the treatment of dyslipidemia. *Exp Rev Cardiovasc Ther* 1: 495-505.

Rubins H. 1998. The veterans affairs HDL intervention trial (VA-HIT) [Vortrag]. Presented at plenary session XII of the 71<sup>st</sup> Annual Meeting of the American Heart Association, Dallas, Nov 11.

Schenkman JB, Remmer H, Estabrook RW. 1967. Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol Pharmacol* 1: 113-123.

Schiller J, Fuchs B, Arnhold J, Arnold K. 2003. Contribution of reactive oxygen species to cartilage degradation in rheumatic diseases: molecular pathways, diagnosis and potential therapeutic strategies. *Curr Med Chem* 10: 2123-2145.

Schwandt P, Richter WO, Parhofer KG, Hrsg. 2004. Handbuch der Fettstoffwechselstörungen: Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie der Dyslipoproteinämien – Prävention der Atherosklerose. 2. Auflage, 2. Nachdruck. Stuttgart, New York: Schattauer-Verlag.

Scott LJ, Curran MP, Figgitt DP. 2004. Rosuvastatin: a review of its use in the management of dyslipidemia. *Am J Cardiovasc Drugs* 4: 117-138.

Silman N, Artman M, Englberg H. 1965. Effect of magnesium and spermine on the aggregation of bacterial and mammalian ribosomes. *Biochem Biophys Acta* 103: 231-240.

- Smith DA, Jones BC. 1992. Speculations on the substrate structure-activity relationship of cytochrome P450 enzymes. *Biochem Pharmacol* 44: 2089-2098.
- Steals B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. 1998. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 98: 2088-2093.
- Streja D. 2004. Combination therapy for the treatment of dyslipidemia. *Curr Opin Invest Drugs* 5: 306-312.
- Strobel HW, Geng J, Kawashima H, Wang H. 1997. Cytochrome P450-dependent biotransformation of drugs and other xenobiotic substrates in neural tissue. *Drug Metab Rev* 29: 1079-1105.
- Strobel HW, Thompson CM, Antonovic L. 2001. Cytochromes P450 in the brain. Function and significance. *Curr Drug Metabol* 2: 199-214.
- Thiery J, Teupser D. 1998. Genetische Faktoren der Atheroskleroseentstehung. *Z Kardiol* 87: 777-787.
- Todd PA, Ward A. 1988. Gemfibrozil: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in dyslipidaemia. *Drugs* 36: 314-339.
- Tomita M, Okuyama T, Kawai S. 1990. Determination of malonaldehyde in oxidized biological materials by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 515: 391-397.
- UK HDL-C Consensus Group. 2004. Role of fibrates in reducing coronary risk: a UK consensus. *Curr Med Res Opin* 20: 241-247.
- Urban T, Hurbain I, Urban M, Clement A, Housset B. 1995. Oxidants and antioxidants. Biological effects and therapeutic perspectives. *Ann Chir* 49: 427-434.
- Vendemiale G, Grattagliano I, Altomare E. 1999. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int J Clin Lab Res* 29: 49-55.
- Wagh A, Stone NJ. 2004. Treatment of metabolic syndrome. *Exp Rev Cardiovasc Ther* 2: 213-228.
- Wallace KB, Hrsg. 1997. *Free Radical Toxicology*. Washington, Bristol: Taylor & Francis, 73-153.

Wang JS, Neuvonen M, Wen X, Backman JT, Neuvonen PJ. 2002. Gemfibrozil inhibits CYP2C8-mediated cerivastatin metabolism in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 30: 1352-1356.

White CM. 2002. A review of the pharmacologic and pharmacokinetic aspects of rosuvastatin. *J Clin Pharmacol* 42: 963-970.

## 10. ANHANG

### Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse

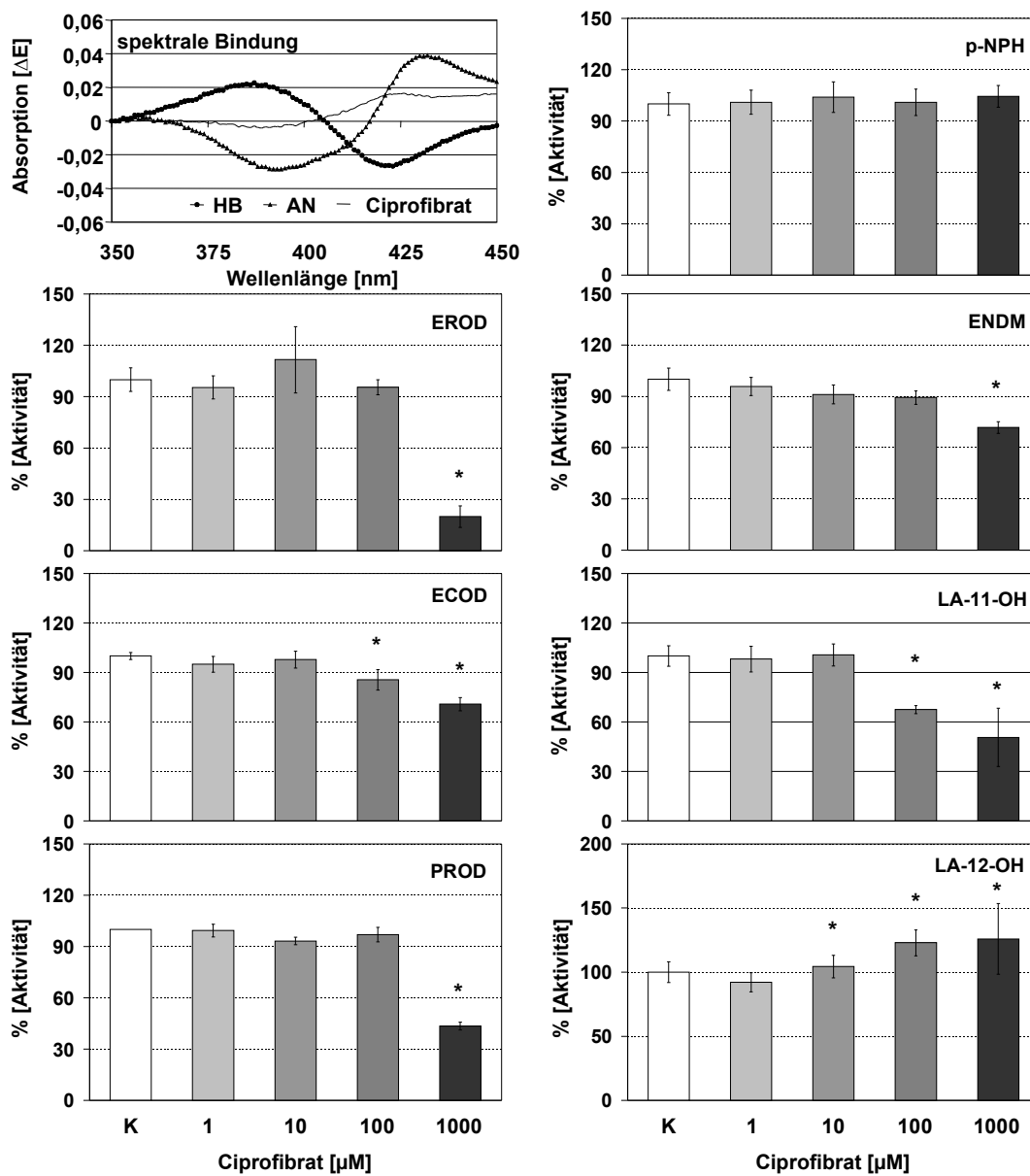
Die folgenden Diagramme zeigen alle Ergebnisse der durchgeführten Modellreaktionen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler (S.E.M.). Die Sterne in den Säulendiagrammen markieren signifikante Unterschiede zum Kontrollwert.

Bei den Substanzen Ciprofibrat, Ciprofibrat-Glycinat, Ciprofibrat-Glycinat-Methylester, Clofibrat und Clofibrat-Glycinat-Methylester werden die Ergebnisse der EROD, der ECOD sowie der ENDM zusätzlich nach Michaelis-Menten (links) und nach Lineweaver-Burk (rechts) dargestellt. In den Darstellungen nach Michaelis-Menten wird ebenfalls der Standardfehler angegeben.

AN: Anilin; ECOD: Ethoxycoumarin-O-Deethylierung; ENDM: Ethylmorphin-N-Demethylierung; EROD: Ethoxyresorufin-O-Deethylierung; GM: Glycinat-Methylester; HB: Hexobarbital; LA-11-OH: 11- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Bildung; LA-12-OH: 12- $\omega$ -Hydroxy-Laurinsäure-Bildung; LCCL: Luminol-verstärkte Chemilumineszenz; LMCL: Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz; LPO: Lipidperoxidation; p-NPH: p-Nitrophenol-Hydroxylierung; PROD: Pentoxyresorufin-O-Depentylierung; Prot.: Protein; VBCL: Chemilumineszenz im Rattenvollblut.

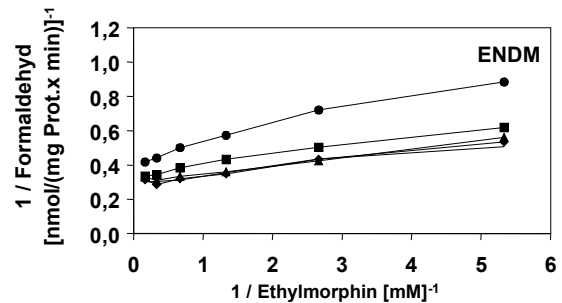
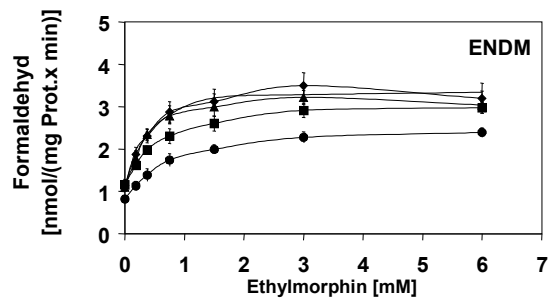
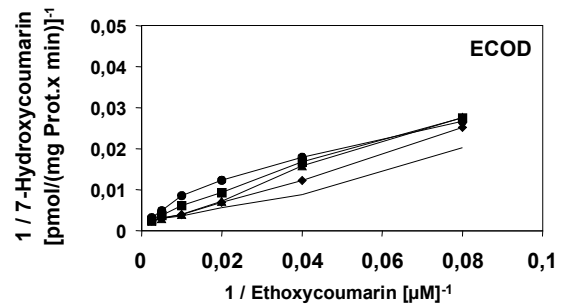
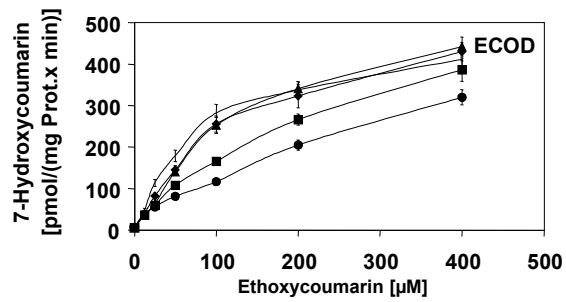
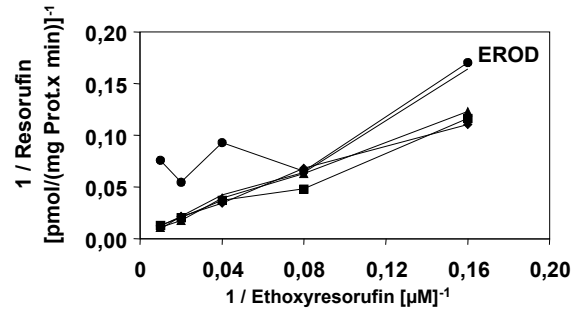
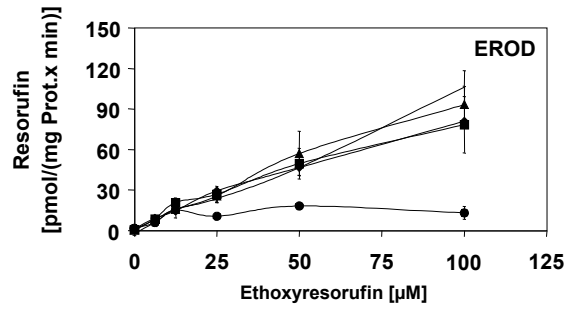
## 10.1. Ciprofibrat

### Monooxygenase-Modellreaktionen





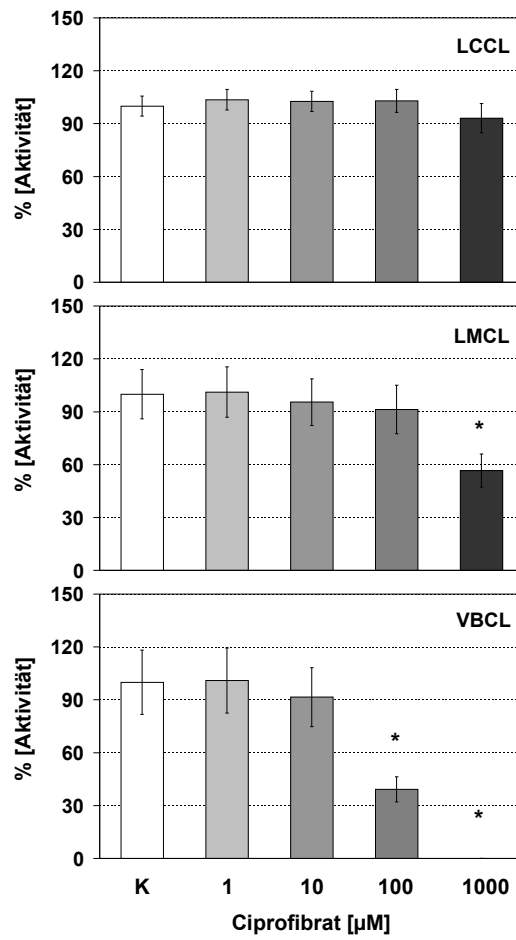
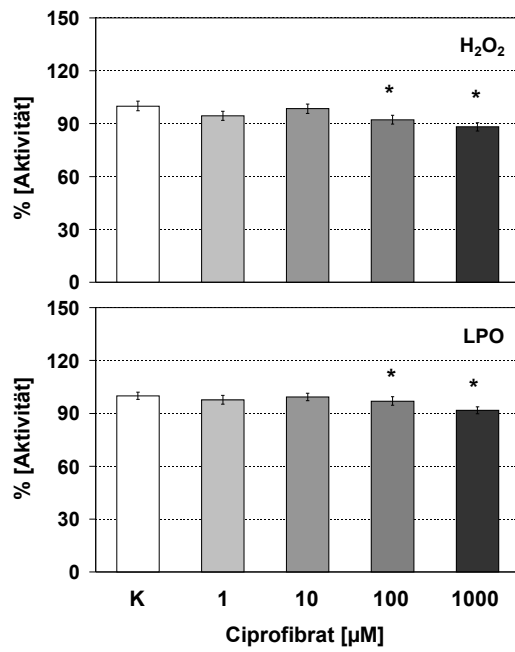
# Monooxygenase-Modellreaktionen: Michaelis-Menten- bzw. Lineweaver-Burk-Darstellung



— Kontrolle

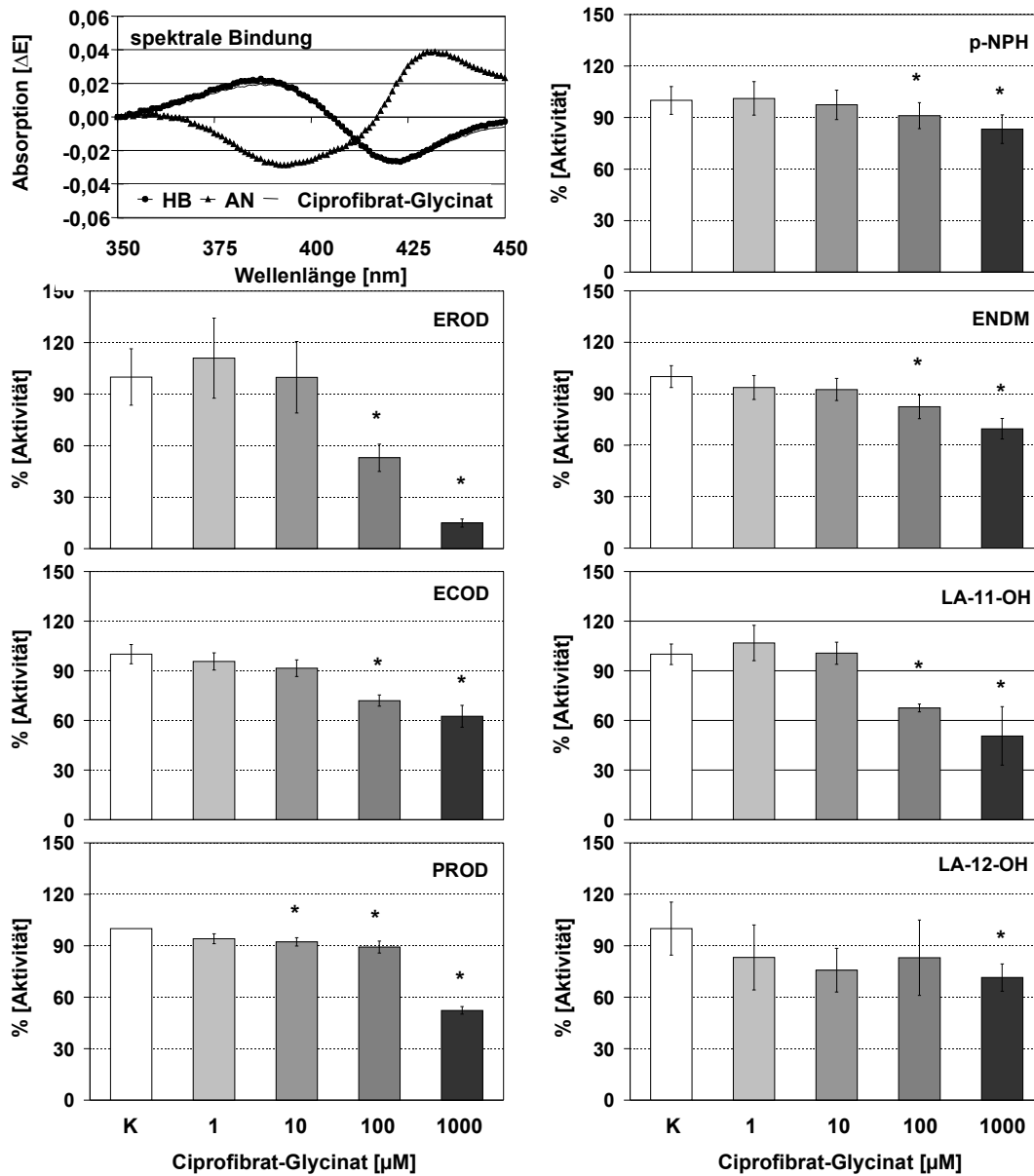
Ciprofibrat:  $\diamond$  1  $\mu\text{M}$ ;  $\triangle$  10  $\mu\text{M}$ ;  $\blacksquare$  100  $\mu\text{M}$ ;  $\bullet$  1000  $\mu\text{M}$

## Oxidase-Modellreaktionen

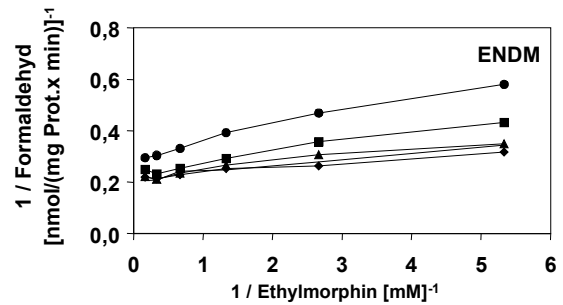
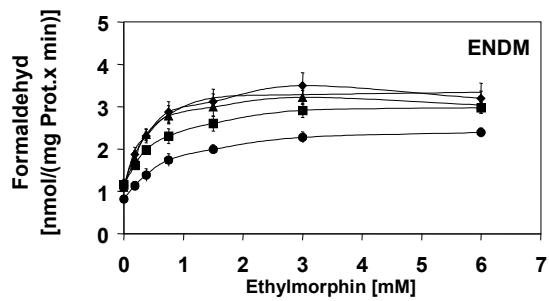
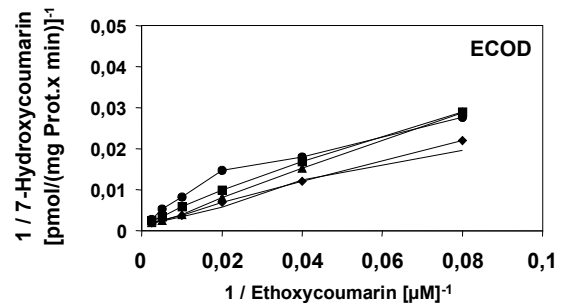
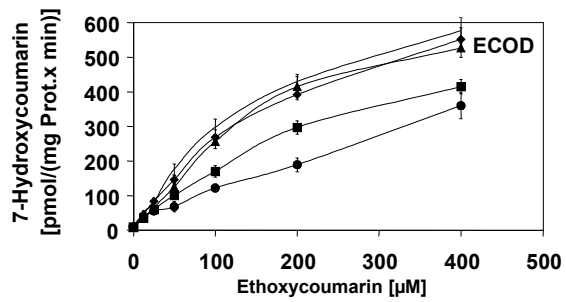
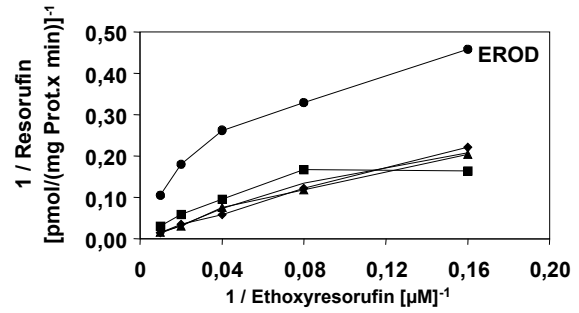
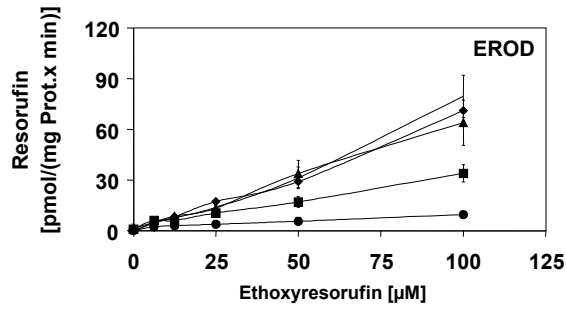


## 10.2. Ciprofibrat-Glycinat

### Monooxygenase-Modellreaktionen



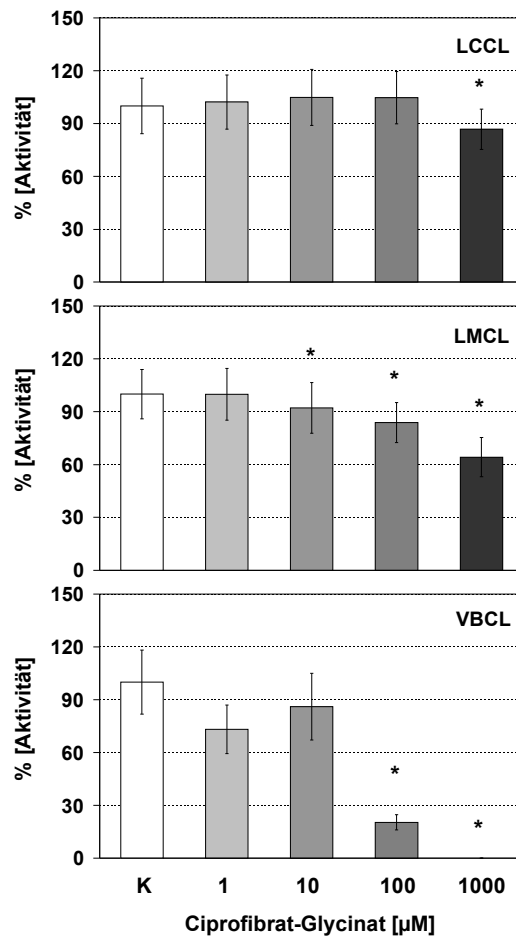
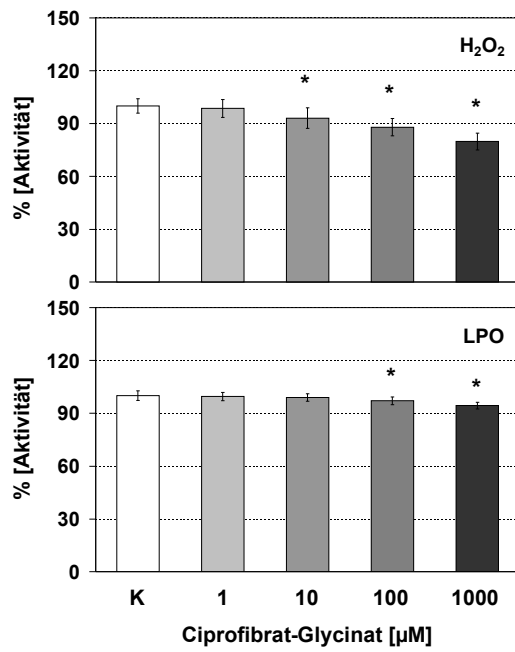
# Monooxygenase-Modellreaktionen: Michaelis-Menten- bzw. Lineweaver-Burk-Darstellung



— Kontrolle

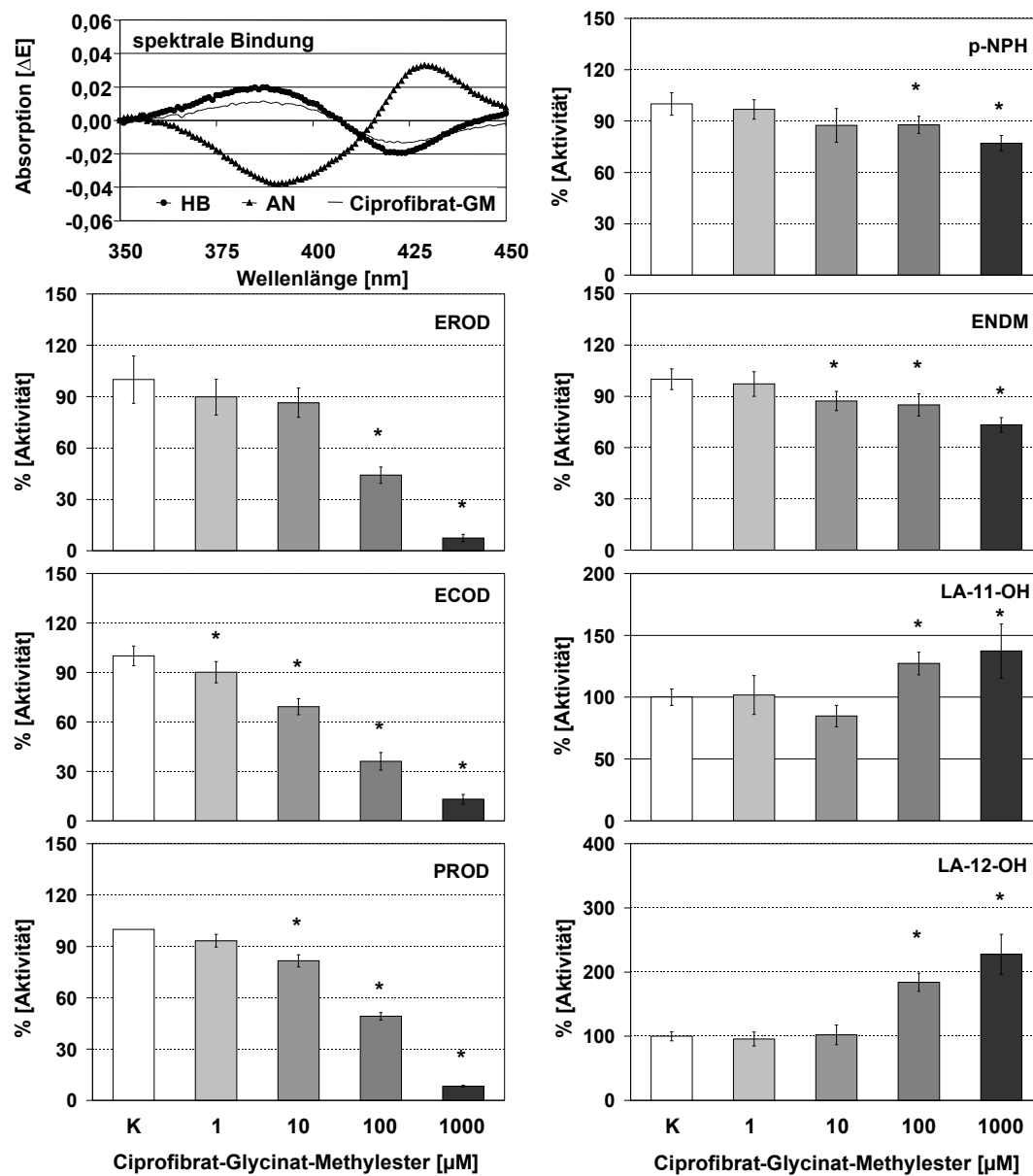
Ciprofibrat-Glycinat:  $\blacklozenge$  1  $\mu\text{M}$ ;  $\blacktriangle$  10  $\mu\text{M}$ ;  $\blacksquare$  100  $\mu\text{M}$ ;  $\bullet$  1000  $\mu\text{M}$

## Oxidase-Modellreaktionen

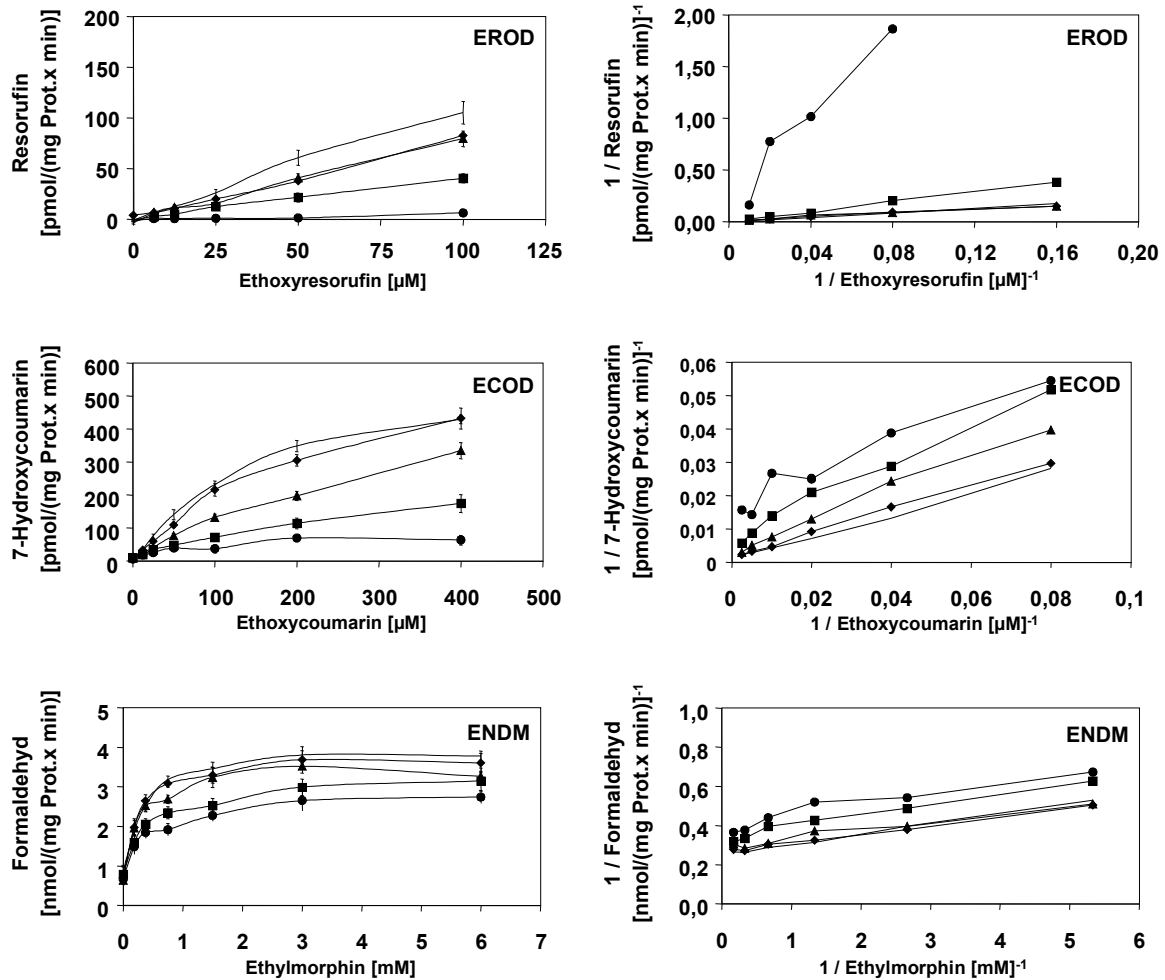


### 10.3. Ciprofibrat-Glycinat-Methylester

#### Monooxygenase-Modellreaktionen



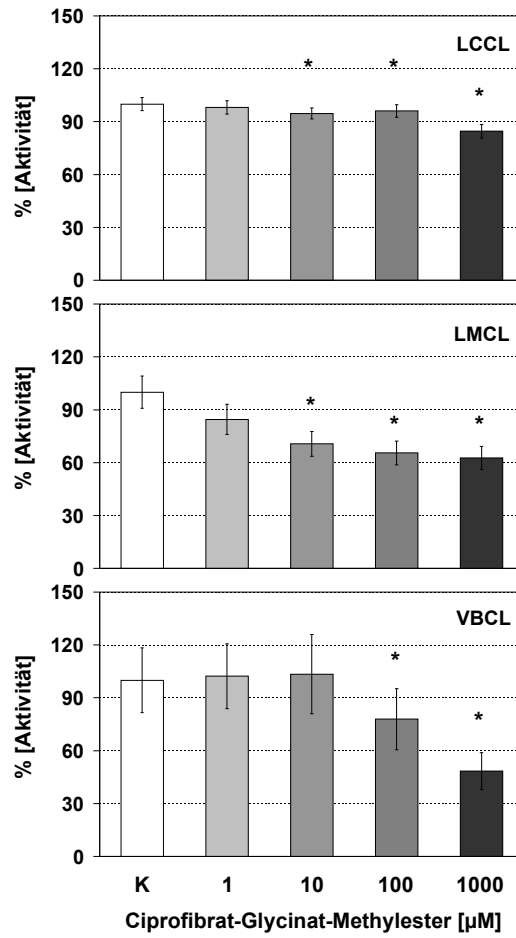
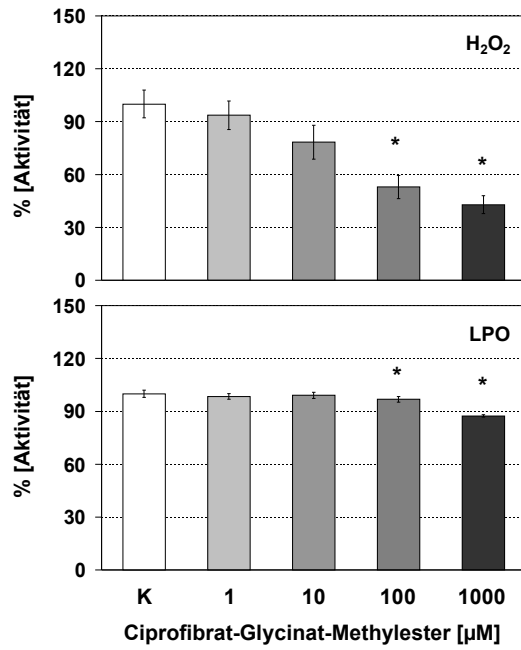
# Monooxygenase-Modellreaktionen: Michaelis-Menten- bzw. Lineweaver-Burk-Darstellung



— Kontrolle

Ciprofibrat-Glycinat-Methylester: ◆ 1 μM; ▲ 10 μM; ■ 100 μM; ● 1000 μM

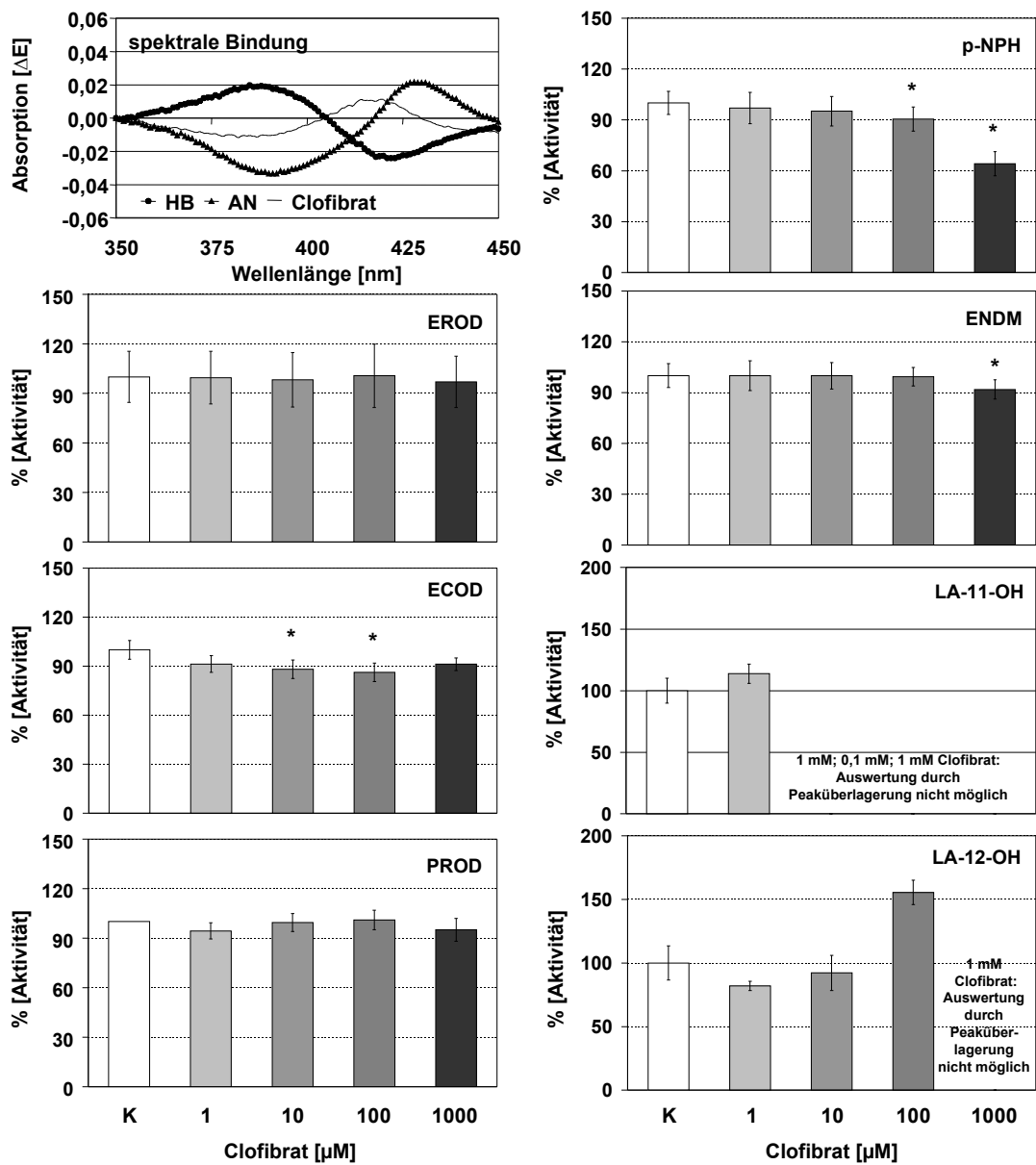
## Oxidase-Modellreaktionen



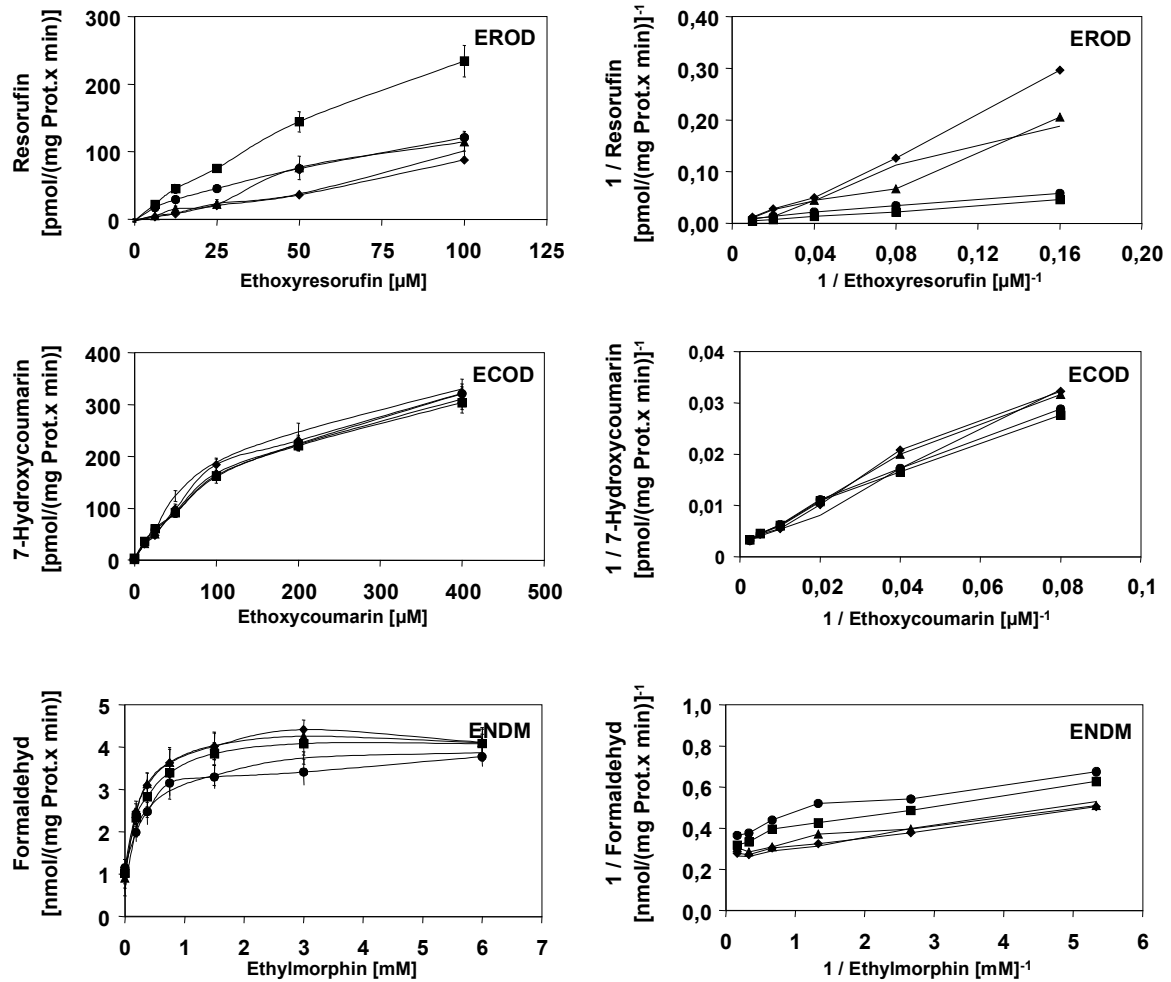


## 10.4. Clofibrat

### Monooxygenase-Modellreaktionen



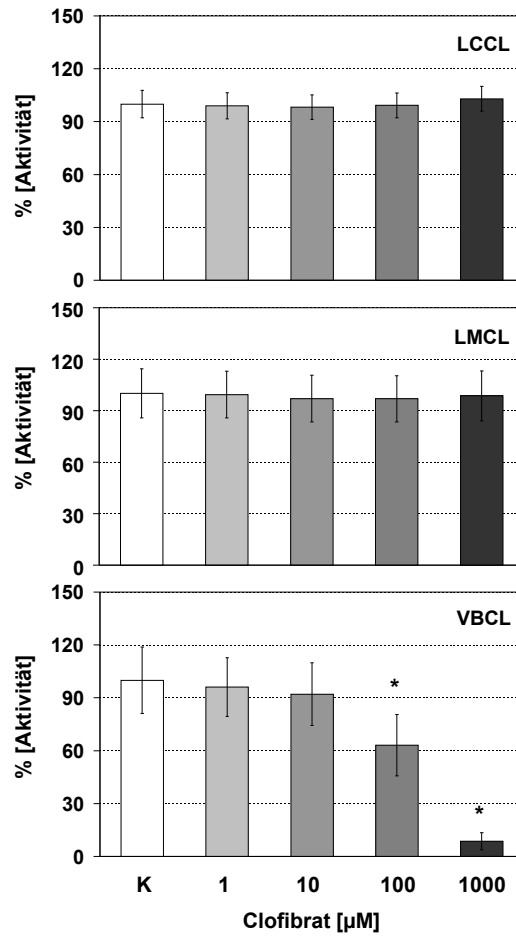
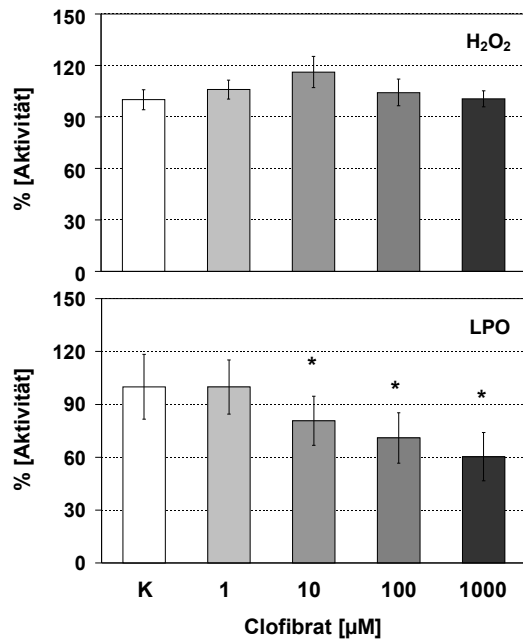
# Monooxygenase-Modellreaktionen: Michaelis-Menten- bzw. Lineweaver-Burk-Darstellung



— Kontrolle

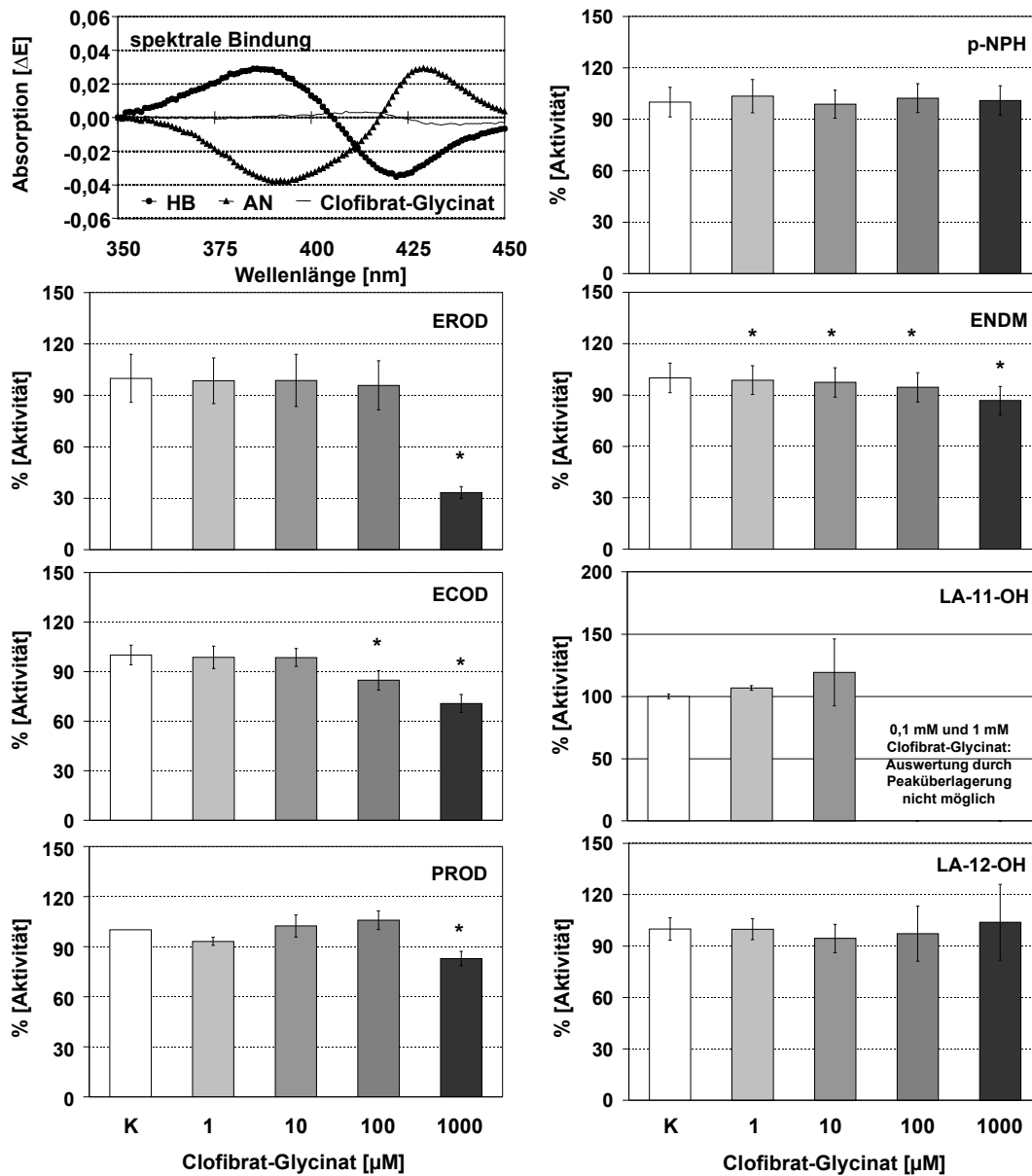
Clofibrat: ◆ 1 μM; ▲ 10 μM; ■ 100 μM; ● 1000 μM

## Oxidase-Modellreaktionen

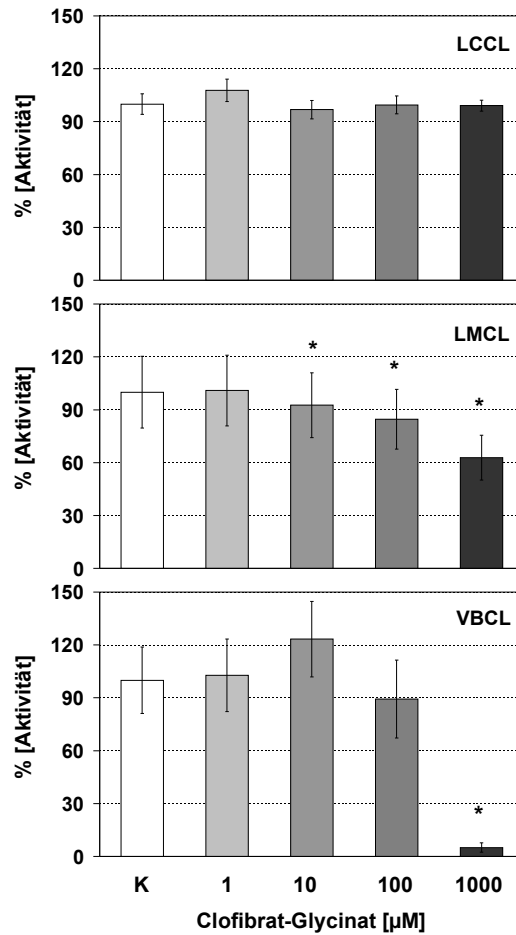
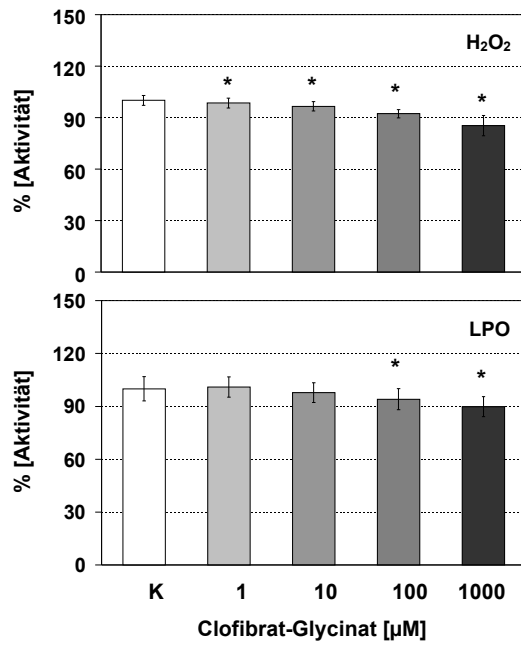


## 10.5. Clofibrat-Glycinat

### Monooxygenase-Modellreaktionen

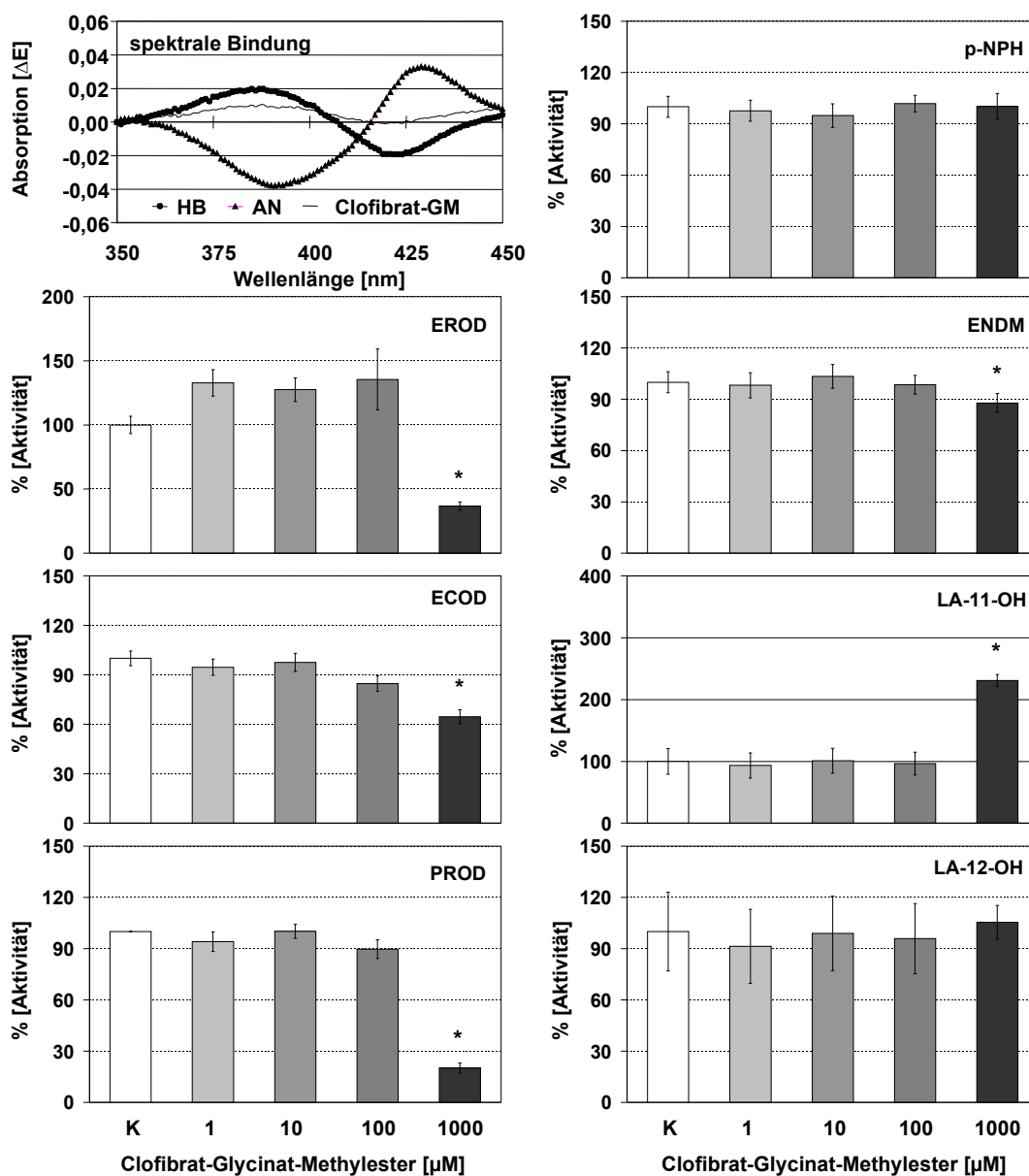


## Oxidase-Modellreaktionen

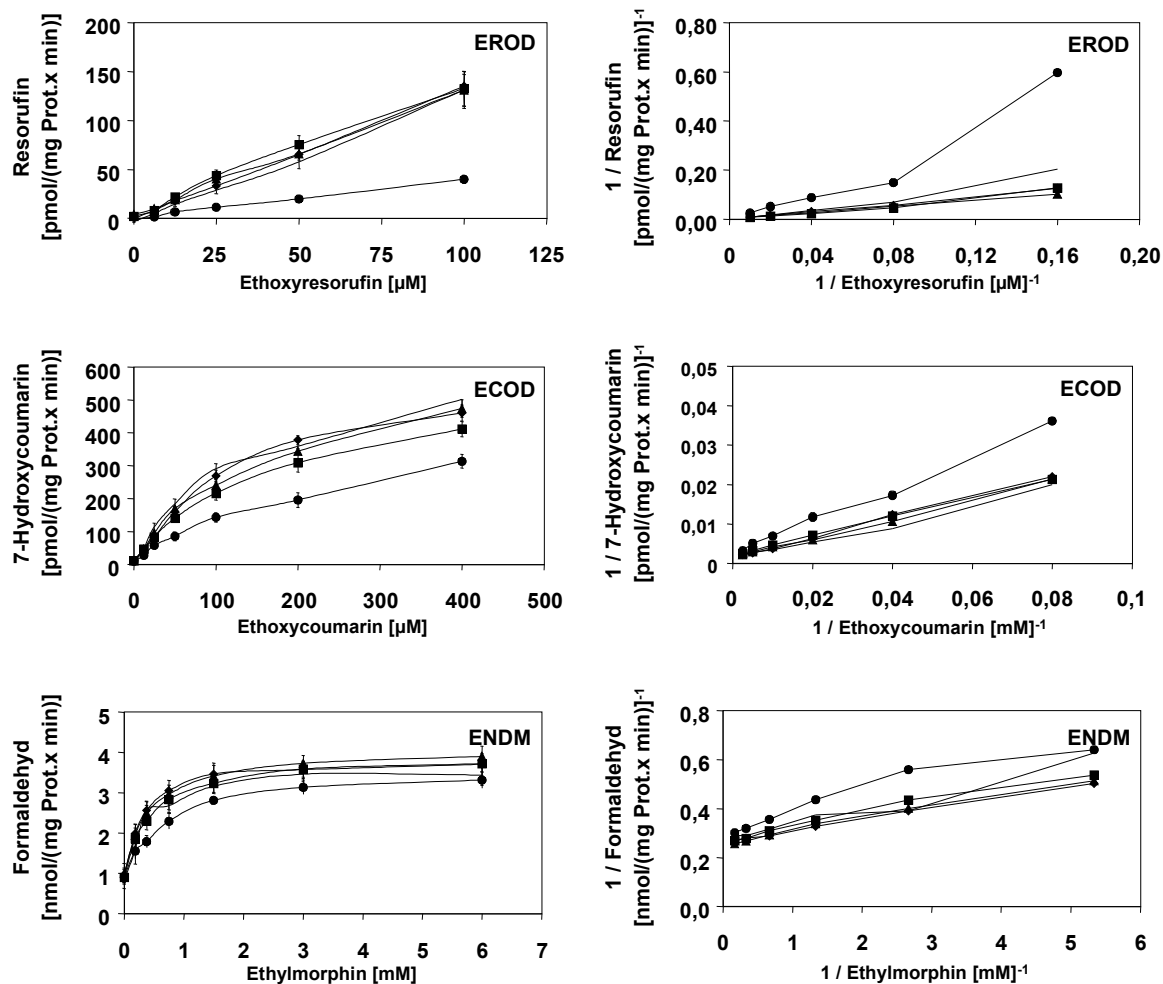


## 10.6. Clofibrat-Glycinat-Methylester

### Monooxygenase-Modellreaktionen



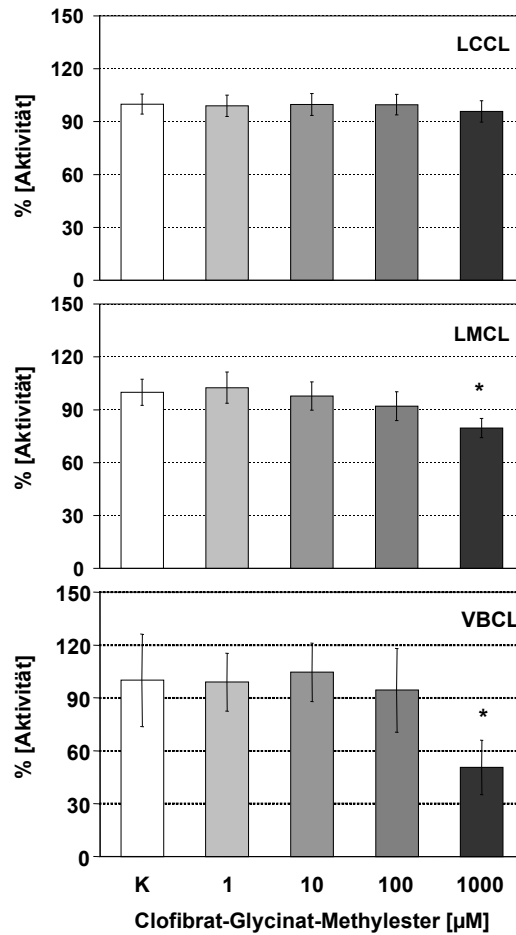
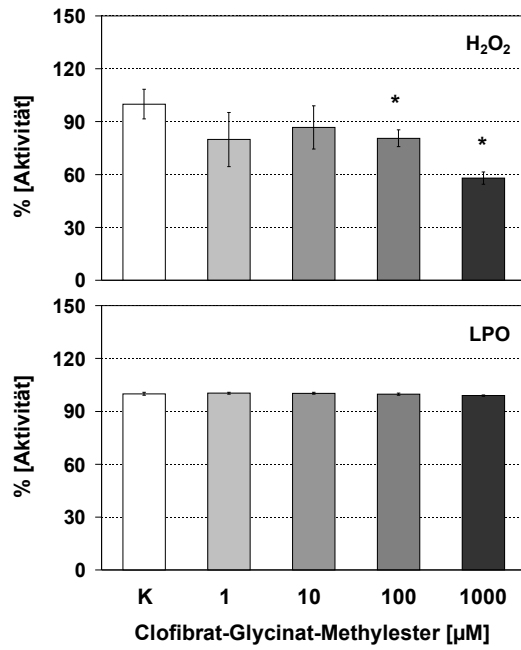
# Monooxygenase-Modellreaktionen: Michaelis-Menten- bzw. Lineweaver-Burk-Darstellung



— Kontrolle

Clofibrat-Glycinat-Metylester: ◆ 1 μM; ▲ 10 μM; ■ 100 μM; ● 1000 μM

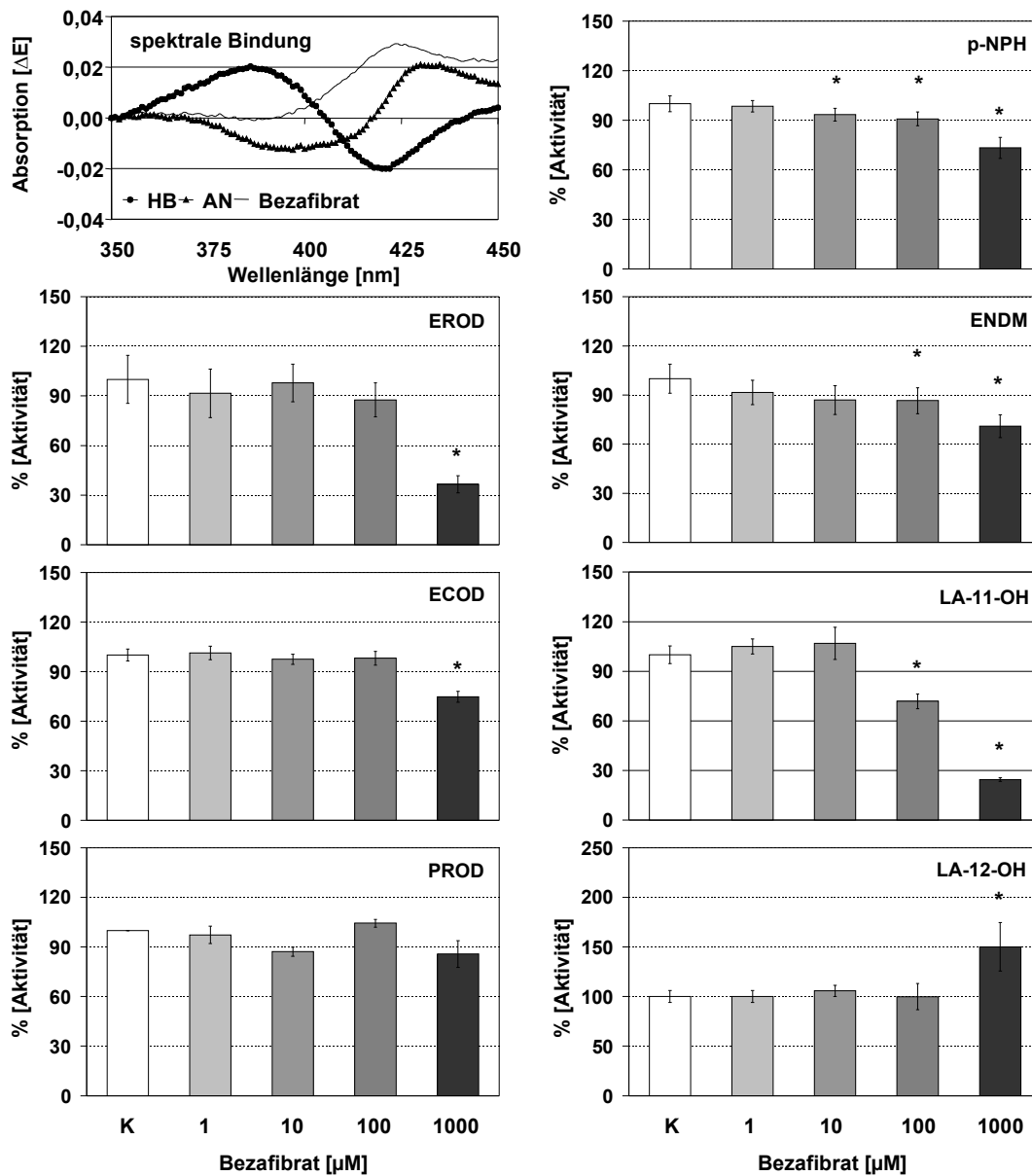
## Oxidase-Modellreaktionen



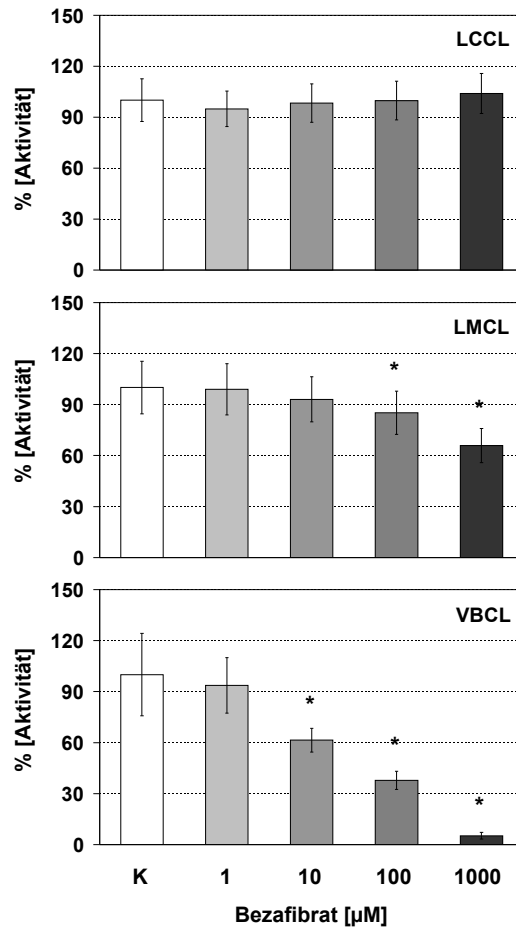
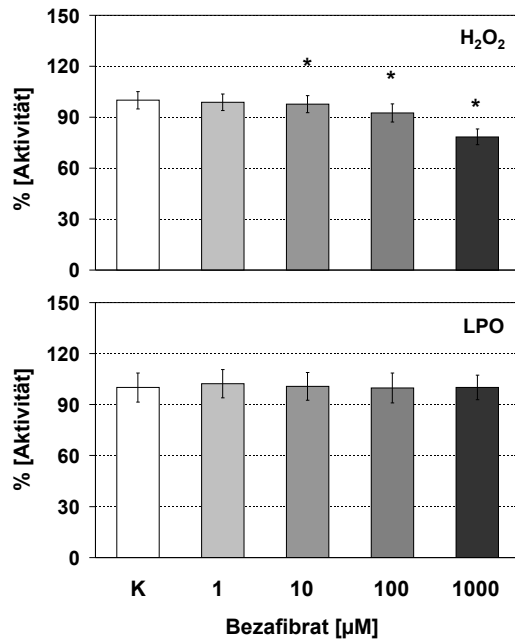


## 10.7. Bezafibrat

### Monooxygenase-Modellreaktionen

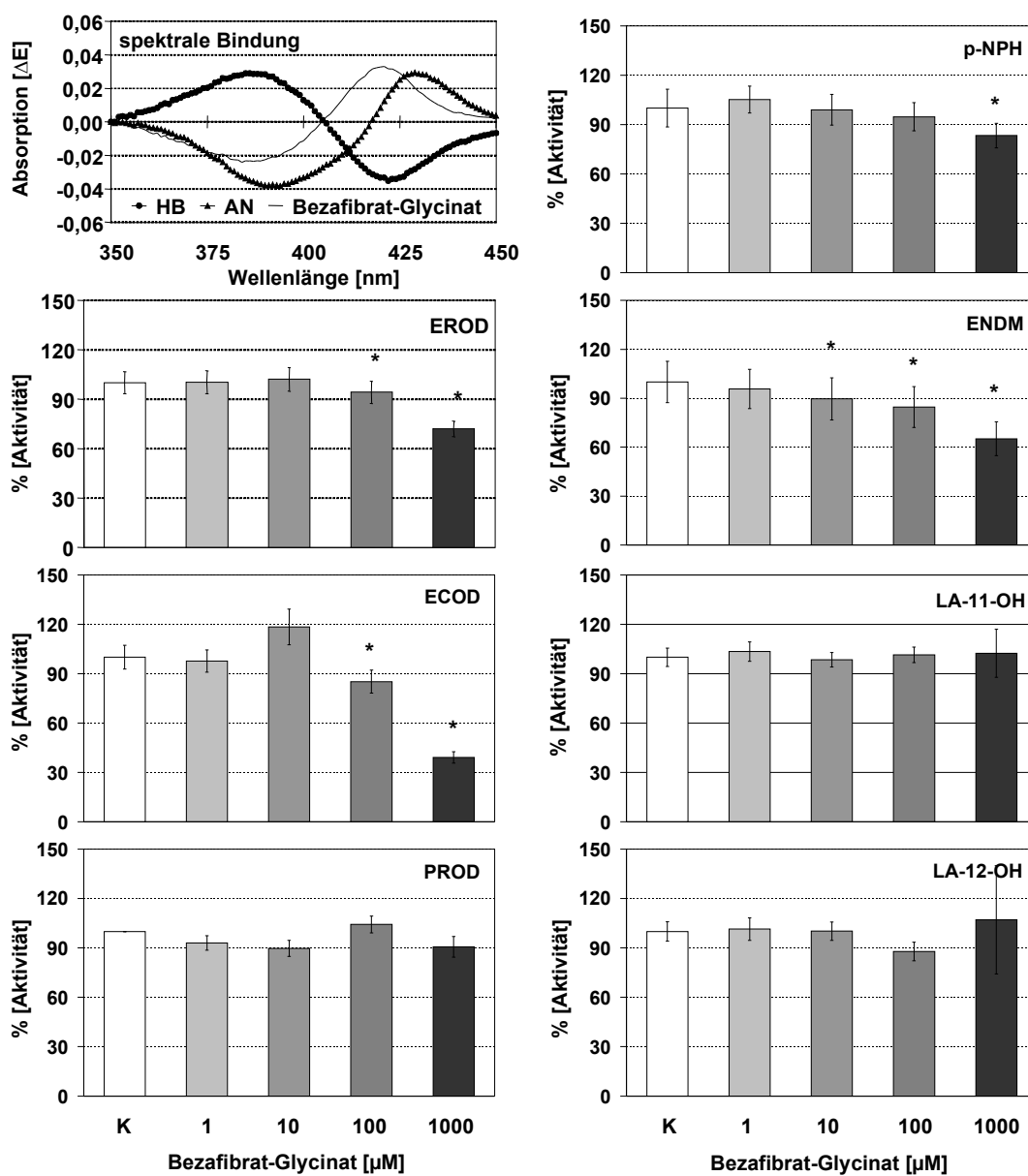


## Oxidase-Modellreaktionen

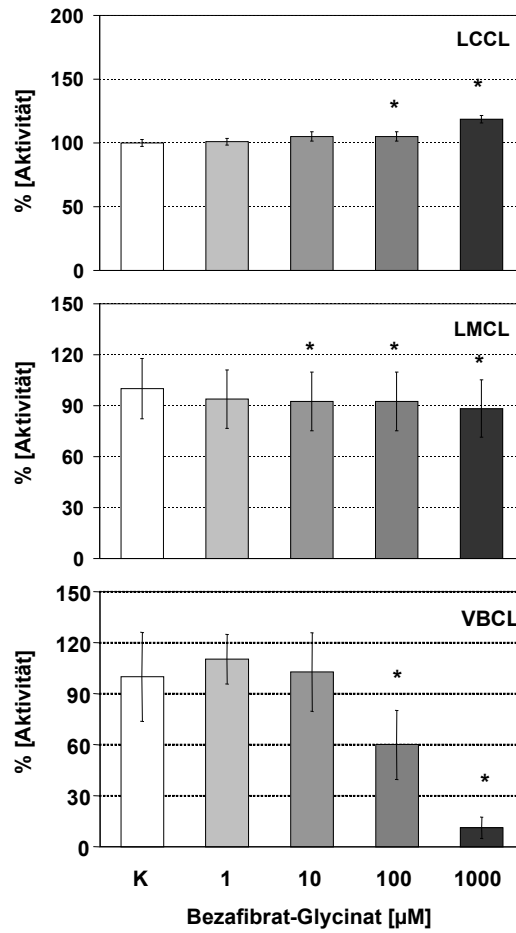
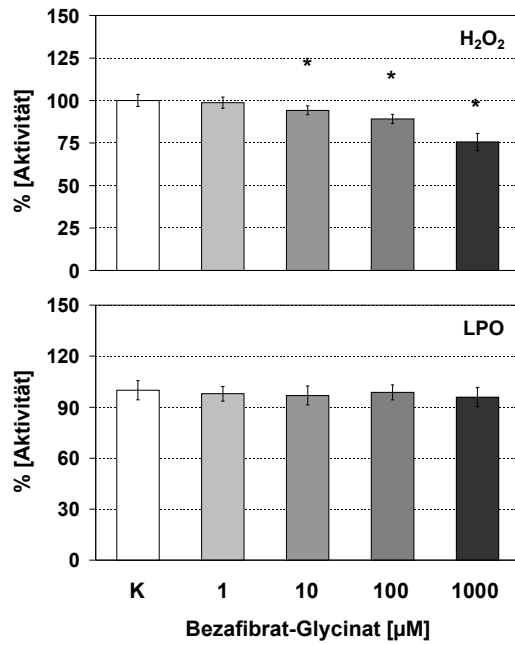


## 10.8. Bezafibrat-Glycinat

### Monooxygenase-Modellreaktionen

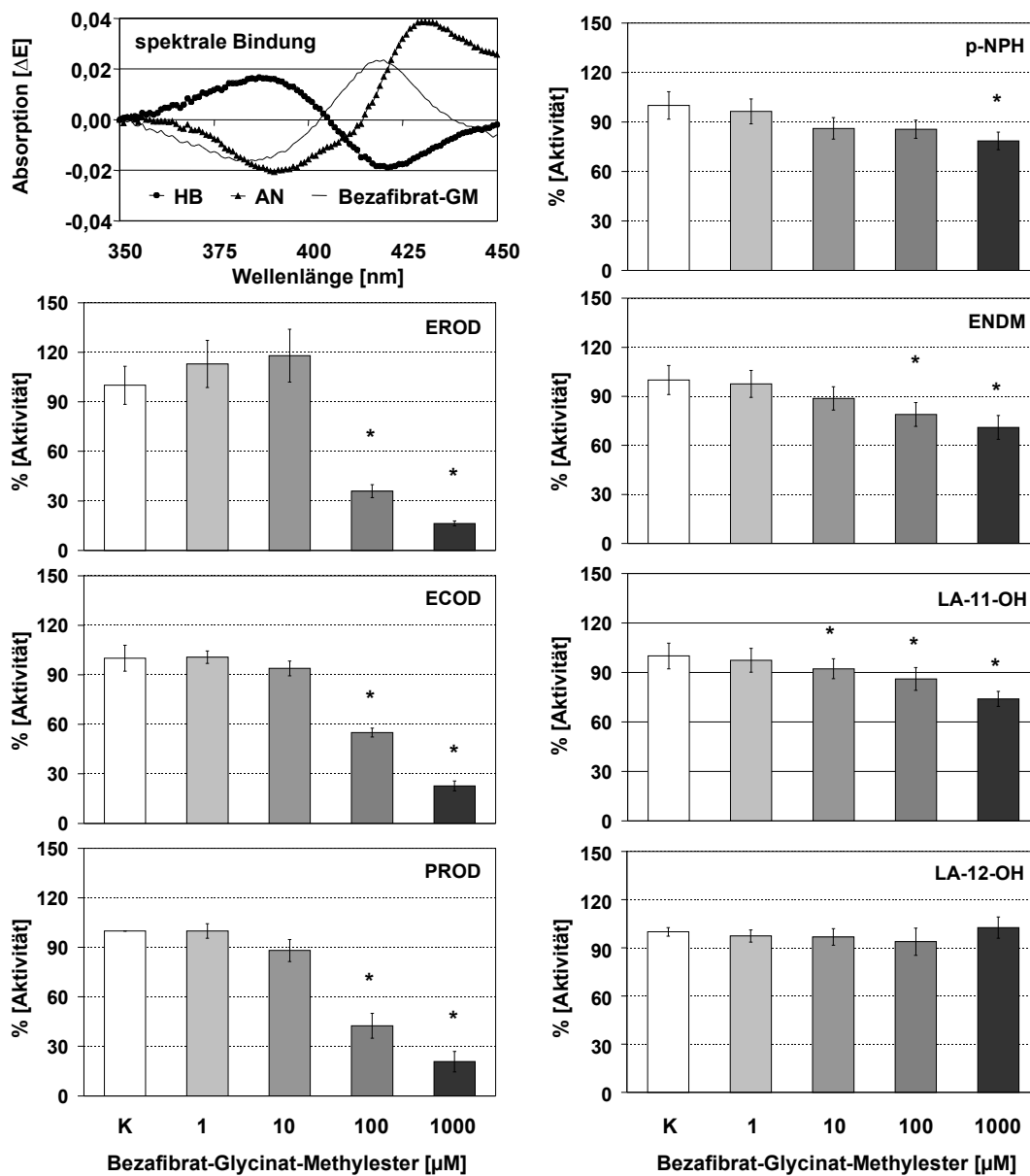


## Oxidase-Modellreaktionen

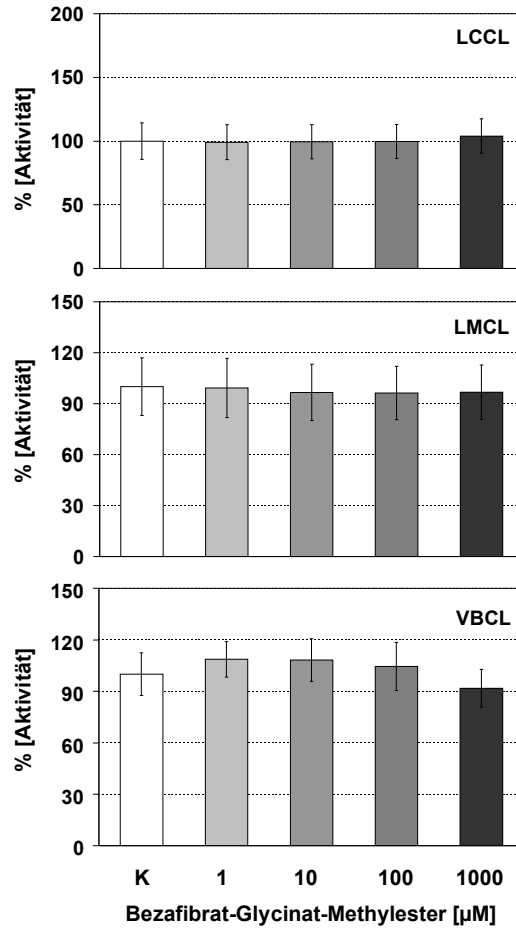
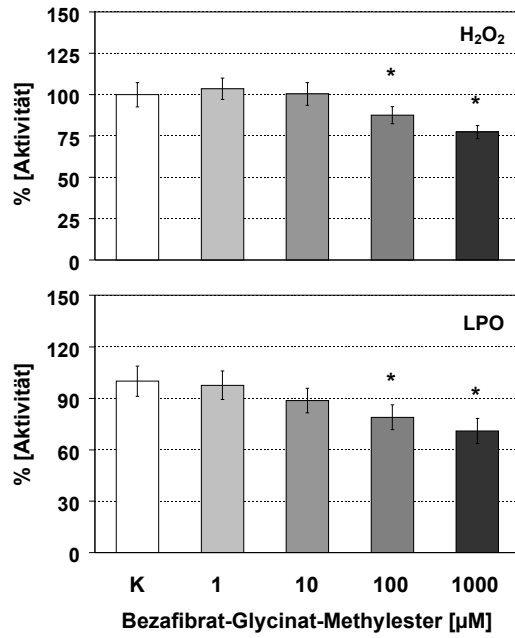


## 10.9. Bezafibrat-Glycinat-Methylester

### Monooxygenase-Modellreaktionen

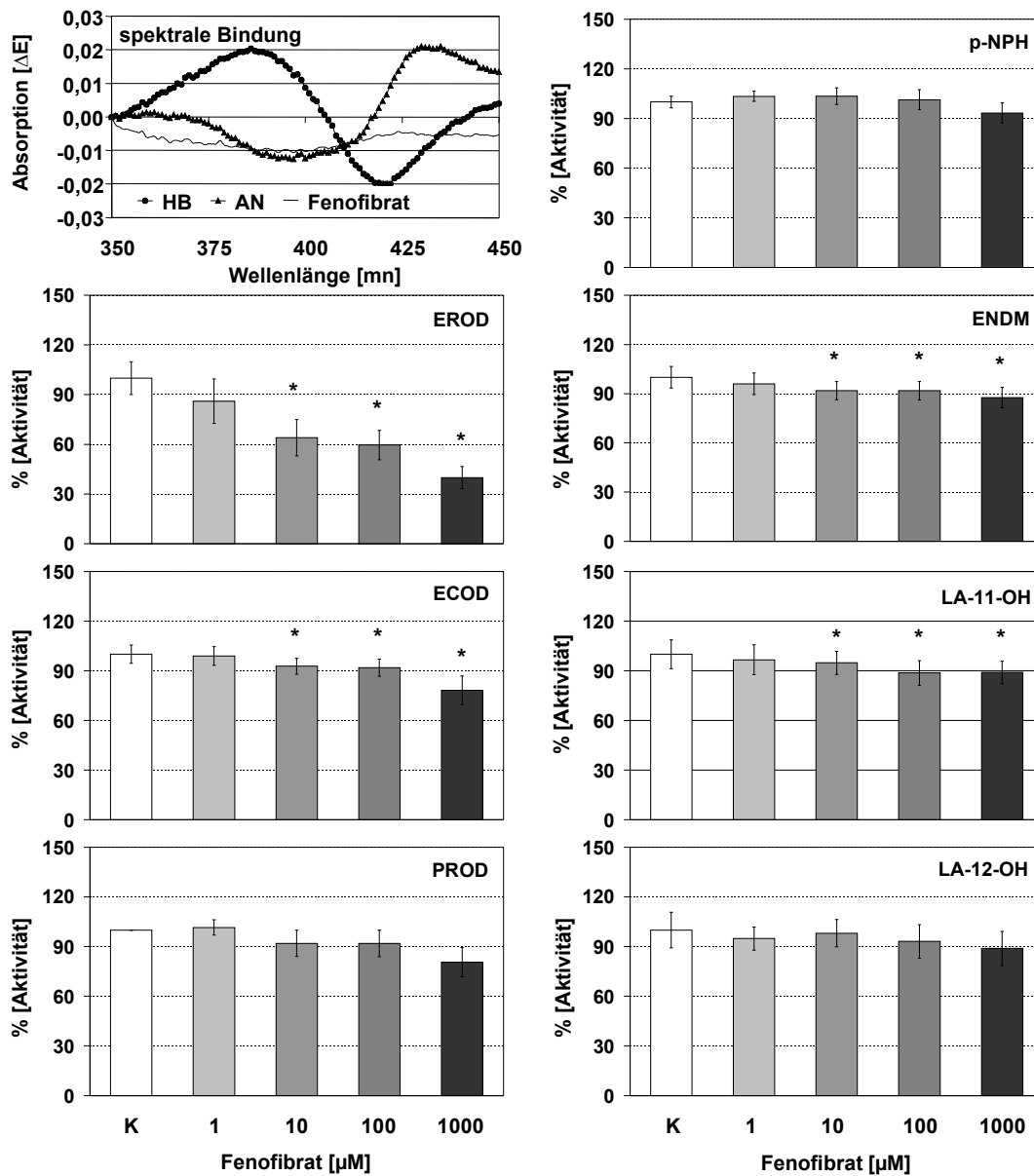


## Oxidase-Modellreaktionen

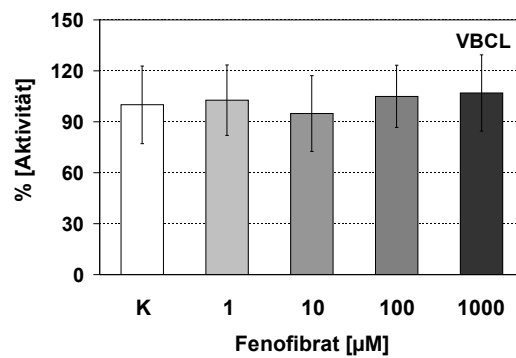
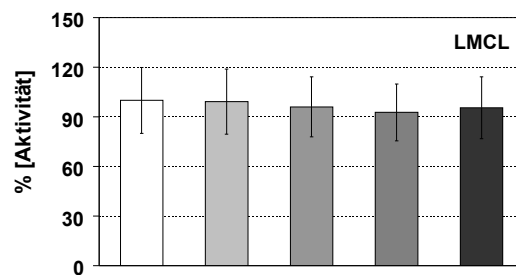
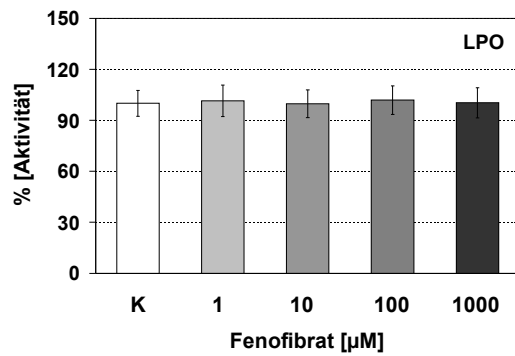
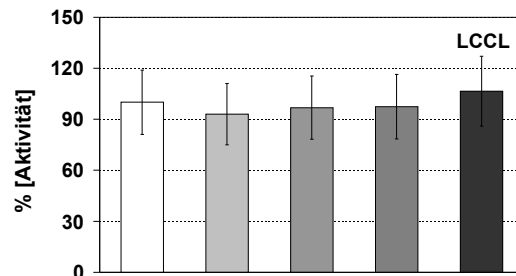
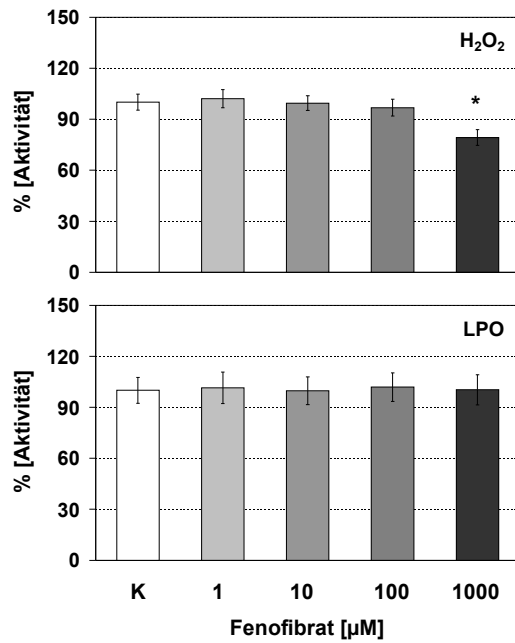


## 10.10. Fenofibrat

### Monooxygenase-Modellreaktionen



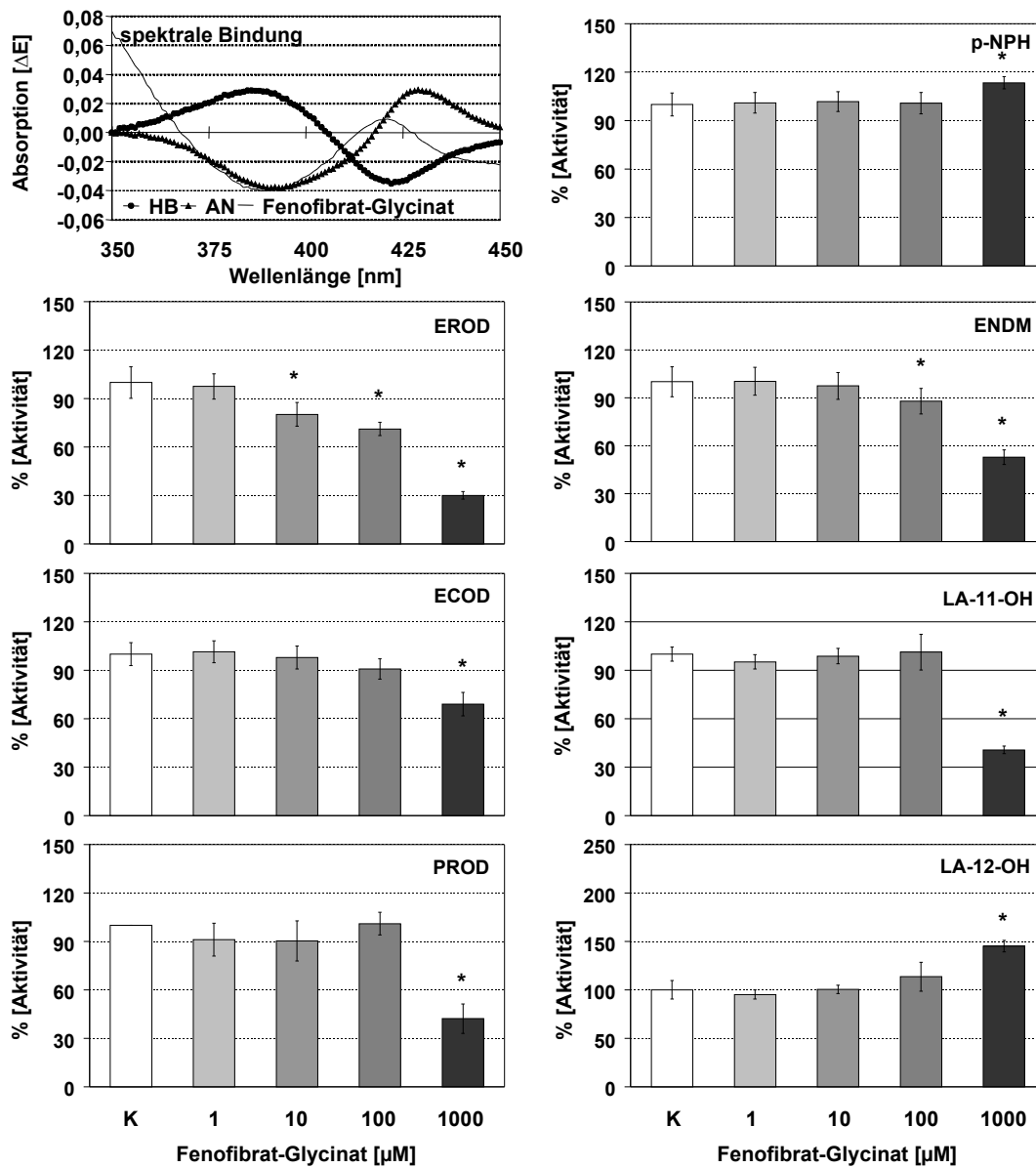
## Oxidase-Modellreaktionen



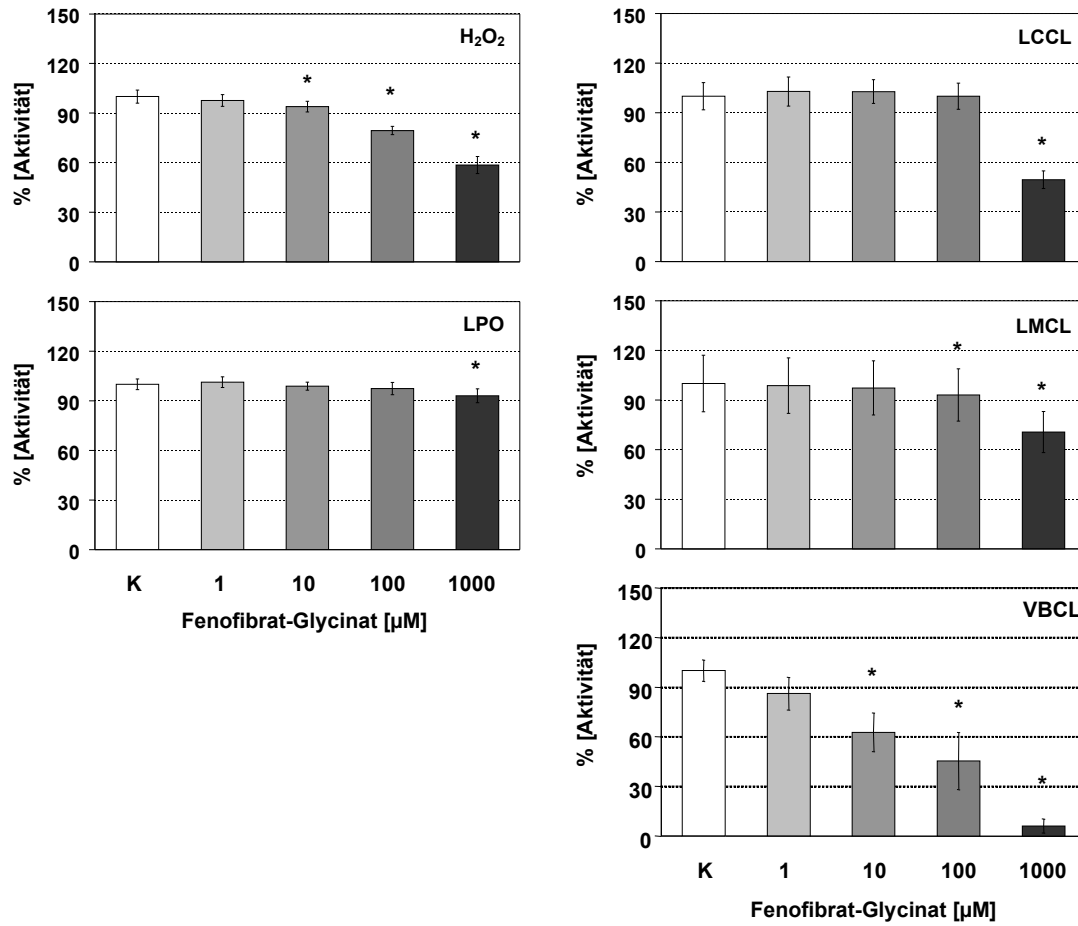


## 10.11. Fenofibrat-Glycinat

### Monooxygenase-Modellreaktionen

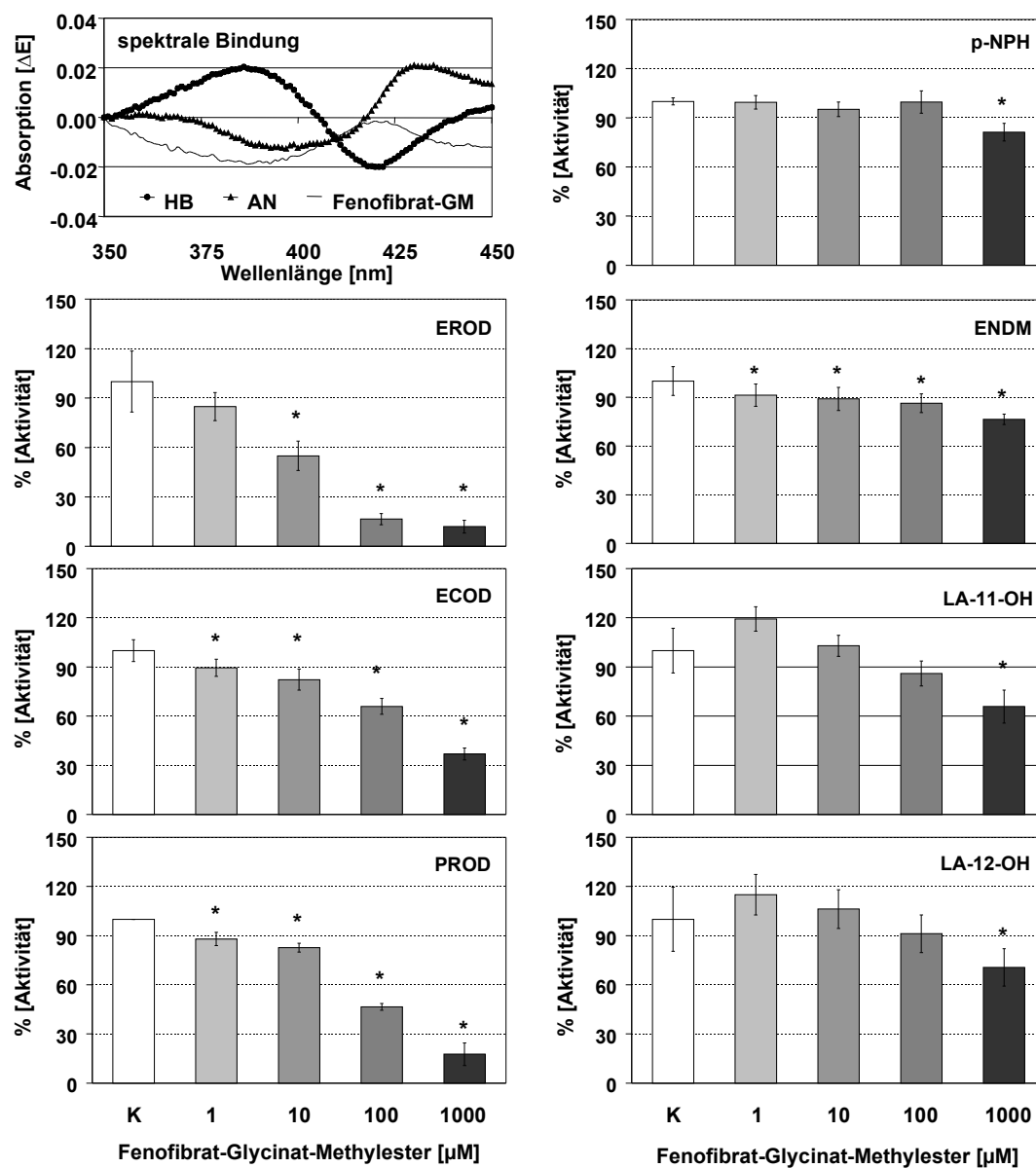


## Oxidase-Modellreaktionen

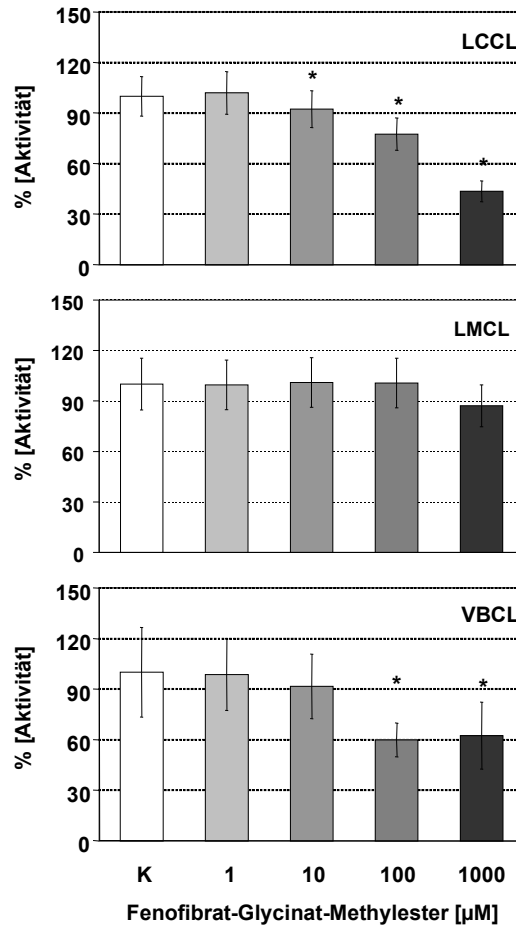
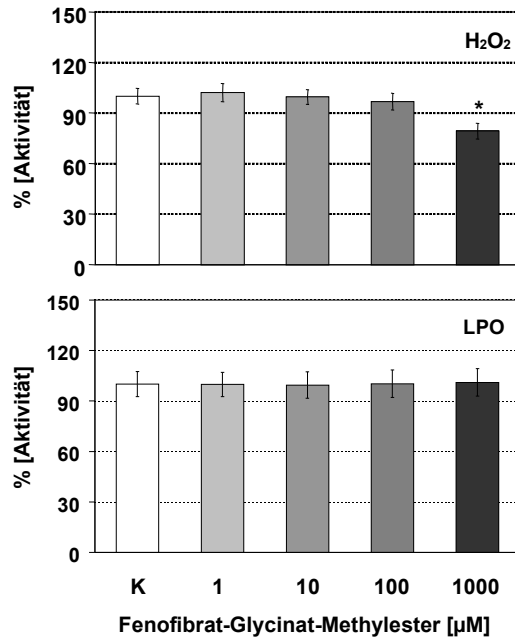


## 10.12. Fenofibrat-Glycinat-Methylester

### Monooxygenase-Modellreaktionen

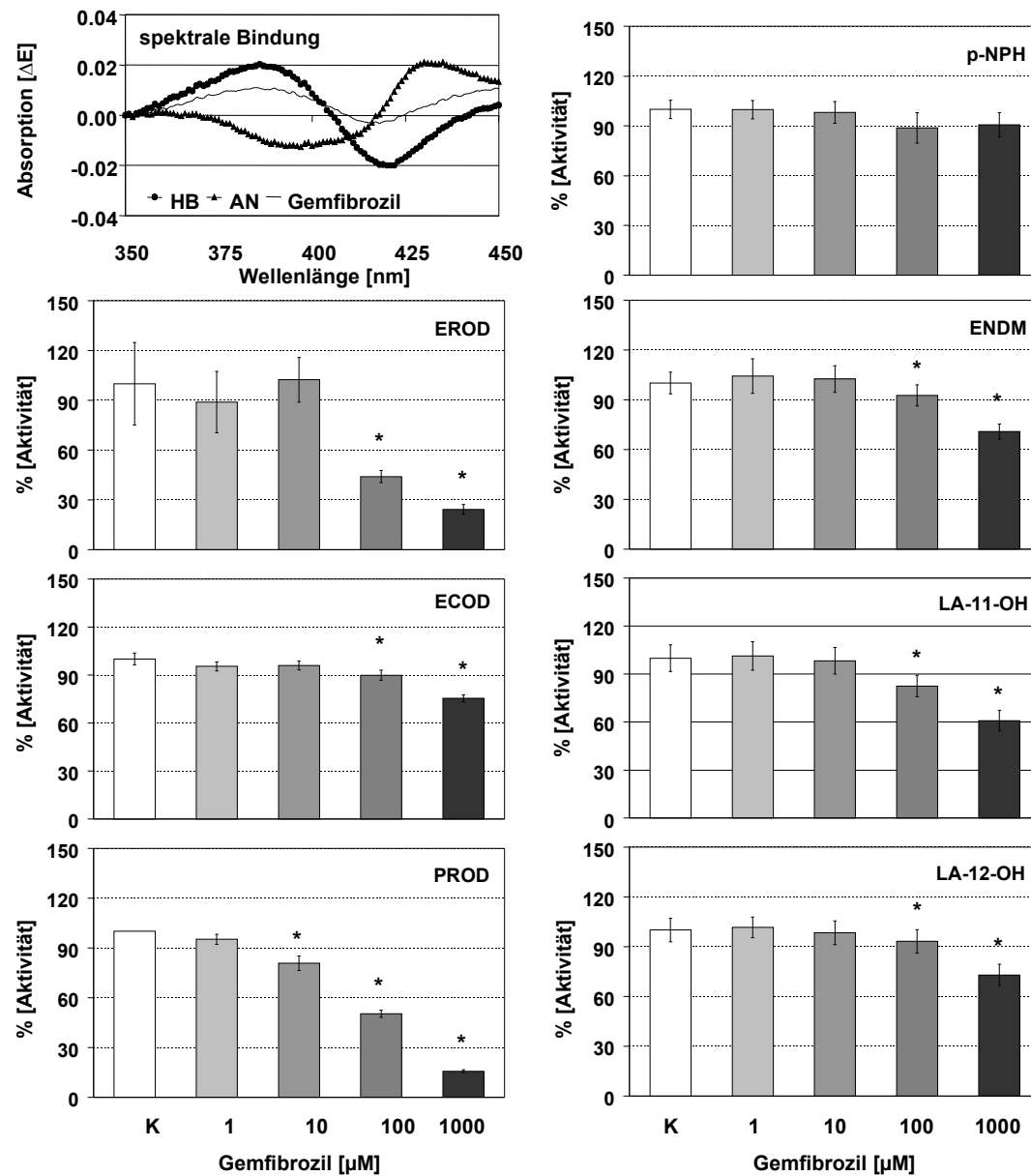


## Oxidase-Modellreaktionen

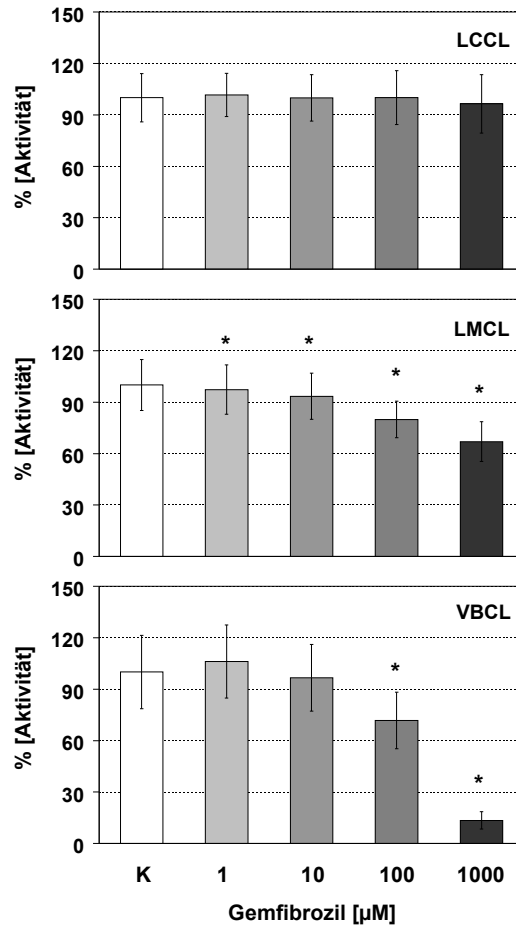
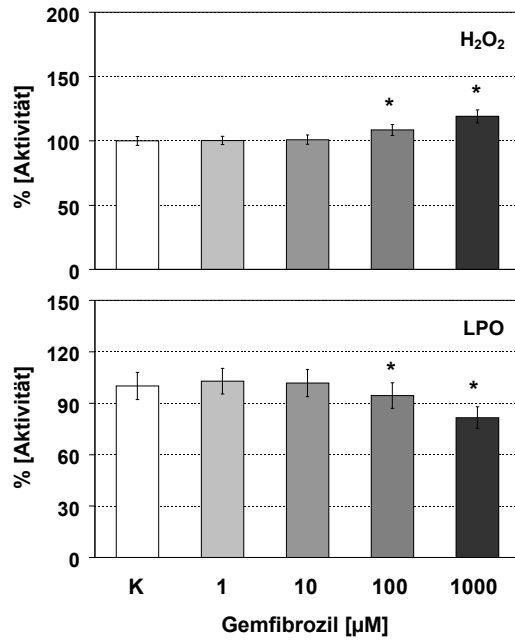


## 10.13. Gemfibrozil

### Monooxygenase-Modellreaktionen

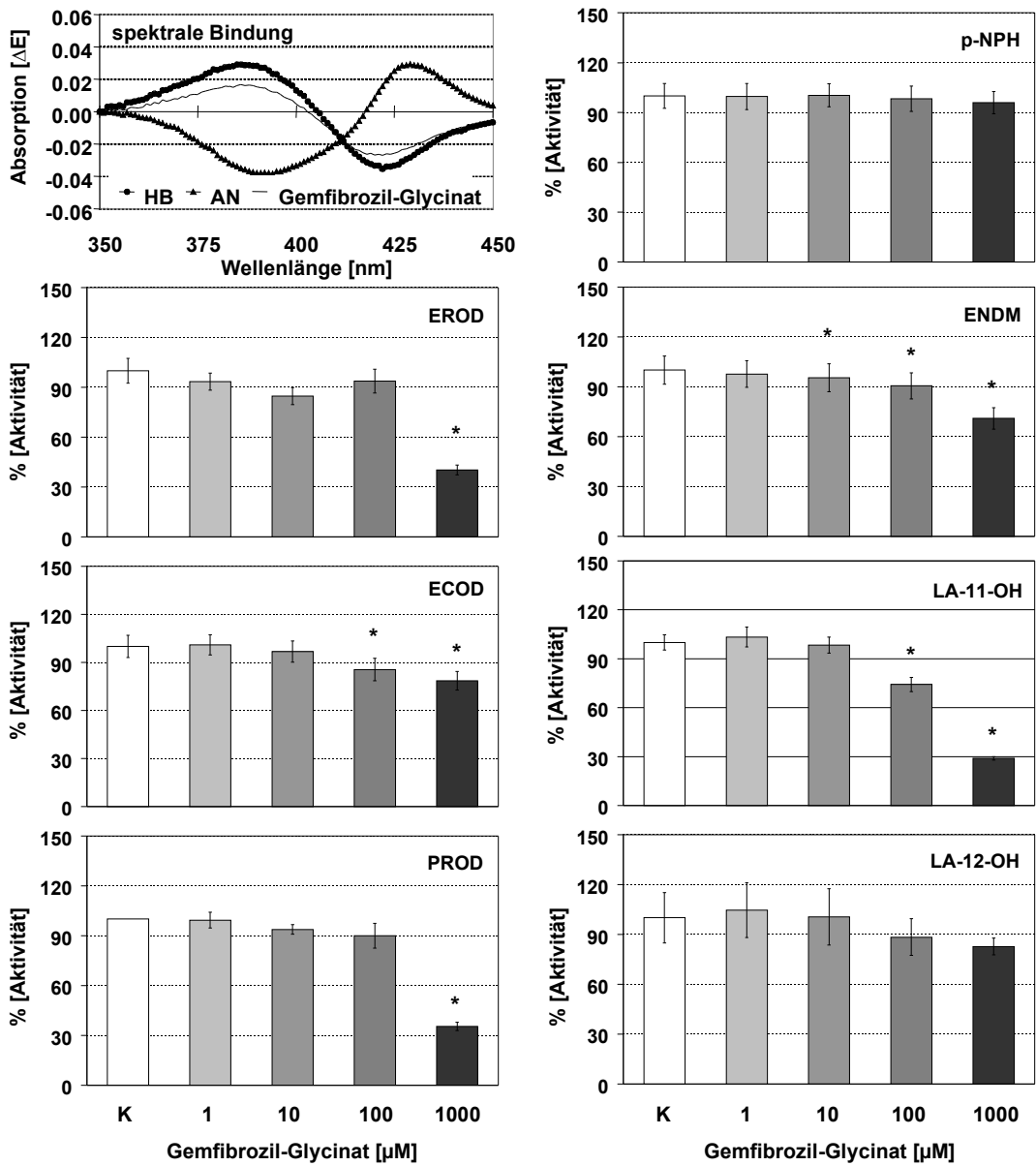


## Oxidase-Modellreaktionen

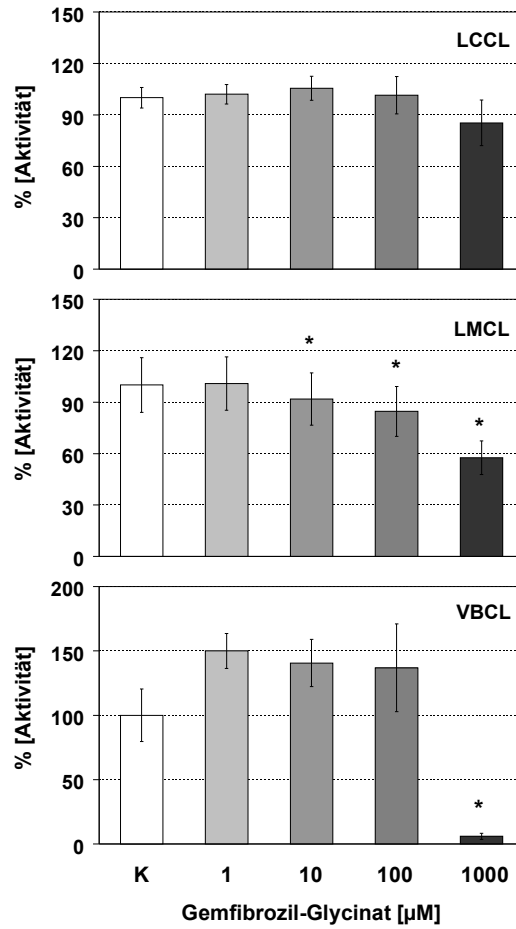
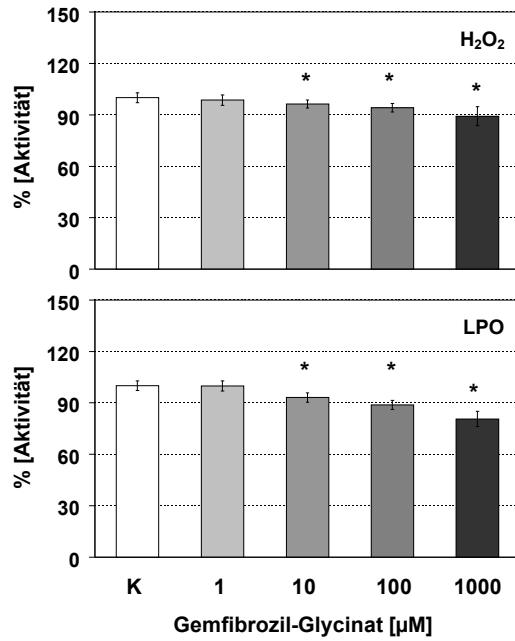


10.14. Gemfibrozil-Glycinat

Monooxygenase-Modellreaktionen



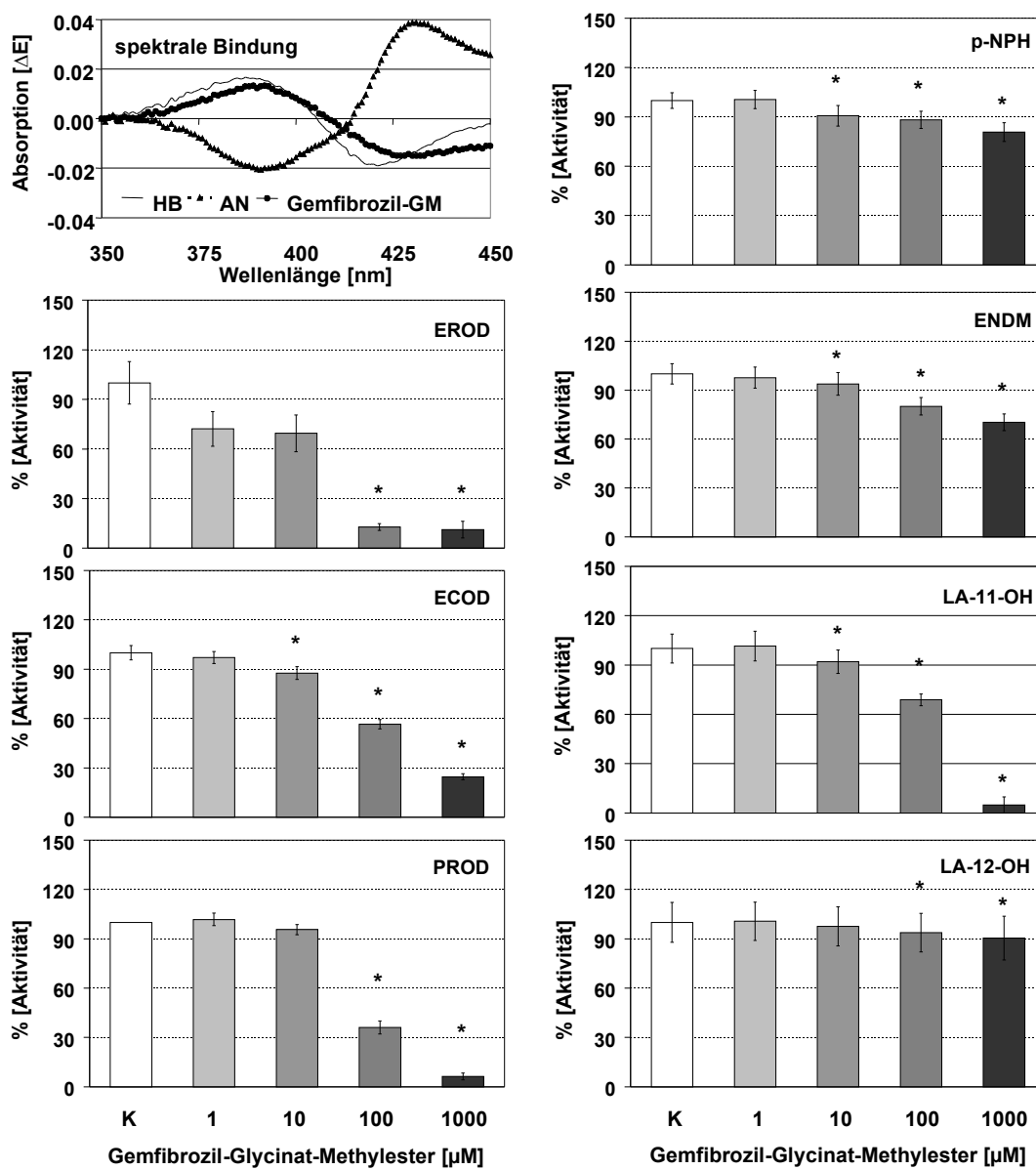
## Oxidase-Modellreaktionen



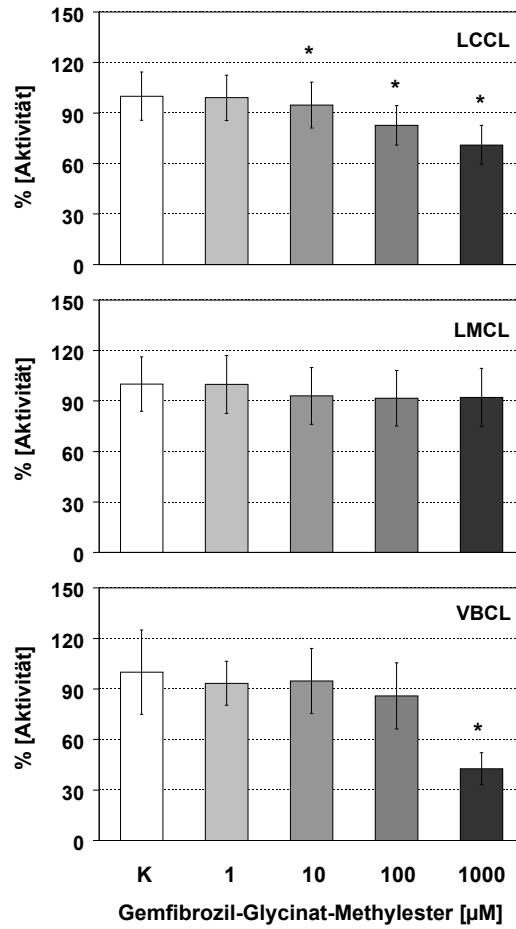
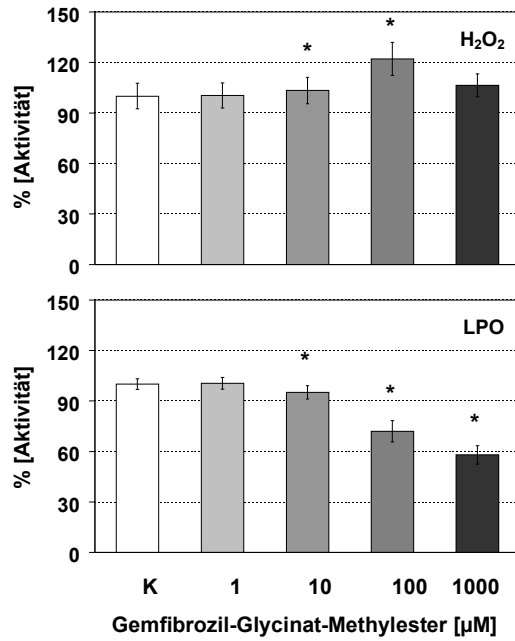


## 10.15. Gemfibrozil-Glycinat-Methylester

### Monooxygenase-Modellreaktionen



## Oxidase-Modellreaktionen



## 11. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Ch. Fleck, Dr. A. Lupp, Dipl. Ing. (FH) E. Karge,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

daß ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

daß ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Heiner Hopf

## **12. DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Ch. Fleck für die Vergabe des Themas sowie bei Frau Dr. A. Lupp, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dipl. Ing. (FH) E. Karge für die engagierte Einweisung in die Labormethoden und die Unterstützung bei den Untersuchungen zur Chemilumineszenz sowie bei den HPLC-Messungen.

### 13. LEBENSLAUF

**Name:** Hopf  
**Vorname:** Heiner  
**Geburtsdatum:** 26.7.1972  
**Familienstand:** verheiratet  
**Kinder:** 1 Sohn, geb. am 2.2.1996, 1 Tochter, geb. am 30.6.1999  
**Schulbildung:** 1979-1987 POS in Greiz  
1987-1991 Spezialechule mathematisch-naturwissenschaftlicher  
Richtung „Carl Zeiss“ in Jena, Abitur  
**Zivildienst:** 1991-1992 beim Rettungsdienst des DRK Jena, Ausbildung zum  
Rettungssanitäter  
**Hochschulbildung:** 1992-1999 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-  
Universität Jena, Gesamtnote „gut“  
**Erziehungsjahr:** 8/1998-8/1999  
**Beruf. Tätigkeiten:** von 1/2000-30.6.2001 AIP in der Inneren Abteilung des  
Kreiskrankenhauses Schleiz  
Seit 7/2001 AiW am Saale-Orla-Klinikum, Standort Schleiz, Innere  
Abteilung

Jena, den

Heiner Hopf